

サンゴ骨格中の有機物分析による古環境分析の新展開

岨 康輝*・渡邊 剛**・鈴木 德行**

(2007年7月21日受付, 2008年4月21日受理)

Implication of organic matter in coral skeletons as proxy for paleoenvironmental reconstruction

Kohki SOWA*, Tsuyoshi WATANABE** and Noriyuki SUZUKI**

*** Department of Natural History Sciences, Graduate School of Science,
Hokkaido University
N10W8 Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060-0810, Japan

Various information on the geochemical characteristics of seawater is recorded in reef-building coral skeletons, which have been widely utilized for the high temporal resolution (one or two weeks) analysis of paleoenvironment in the tropical ocean. The stable oxygen/carbon isotopic ratios and trace element contents in coral skeletons are generally applied to the paleoenvironmental reconstruction. The paleoenvironmental analysis based on organic matter in coral skeletons, however, has rarely been performed. Organic analysis of coral skeletons has been conducted mainly for the understanding of coral biomineralization. Coral organic matter, which is much less reactive than sedimentary organic matter, can be a useful paleoenvironmental proxy. Combination of organic and inorganic geochemical analyses for coral skeletons will be a powerful tool to provide more information on the paleoenvironment.

Key words: coral skeletons, organic matter, paleoenvironment, nitrogen isotope, biomineralization

1. はじめに

造礁性サンゴや冷水性サンゴは熱帯・亜熱帯から寒帯まで幅広く棲息しており、炭酸塩骨格を形成している。この炭酸塩骨格を生み出すプロセスはバイオミネラリゼーション（生物鉱化作用）と呼ばれている。特に、イシサンゴ（Stony Coral）類（以降、「サンゴ」と表示）のバイオミネラリゼーションは、成長方向に付加的に骨格が形成されるため、その骨格形成ごとに生息地域の環境を時間連続的に記録している可能性がある。そのため、近年になり、サンゴは地球の環境変動を高時間分解能（約1~2週間）で克明に記録して

いる試料として、多くの研究が盛んに行われている。特に、古環境解析に関してはサンゴ骨格の主成分である無機炭酸塩の安定同位体比、微量元素などの化学成分に注目して分析が行われてきた（たとえば、Gagan *et al.*, 2000）。しかしながら、サンゴ骨格中に存在している有機物に注目した古環境解析の研究は、これまでほとんど行われてこなかった。

現在、サンゴ骨格の炭酸塩を利用した古環境解析の研究では、分析機器の精度向上や基礎実験の充実により、高精度で高時間分解能なデータを活用した議論が盛んに行われている。しかしながら、それと同時に、サンゴ骨格の微小領域における化学成分に大きな不均質性が見いだされるようになり、サンゴ骨格を単純に古環境解析のツールとして利用することに対して若干の問題点が浮き彫りになってきた（Watanabe *et al.*, 2006）。たとえば、イオンマイクロプローブ等を用い

* 北海道大学大学院理学院自然史科学専攻
〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

** 北海道大学大学院理学研究院自然史科学専攻
〒060-0810 札幌市北区北10条西8丁目

た微小領域化学分析は、サンゴ骨格についてマイクロスケールからナノスケールでの微量元素分析や同位体比分析を可能にした。その結果、微小領域における酸素同位体比や Sr/Ca 比などが、生息域の環境をそのまま反映しているとは考えられない程に偏在していることが判明した (Rollion-Bard *et al.*, 2003; Meibom *et al.*, 2004; Shirai *et al.*, 2005)。

サンゴ骨格中の有機物を利用した古環境復元の研究は、サンゴ骨格中の炭酸塩を利用した研究とは対照的に、これまでほとんど行われてこなかった。有機物を利用した古環境情報の解析の代表的な例として、堆積層中のバイオマーカーを利用して地球表層環境の変動を読み取る試みが挙げられる。サンゴが年輪を刻みながら骨格を形成する過程は一種の沈積作用であり、サンゴ骨格の成長軸に沿って骨格中のバイオマーカーや各種有機物の時系列分析によって、古環境解析に関する新しい見解を得ることができる可能性がある。たとえば、共存する炭酸塩骨格と骨格に含まれる有機物を同時に分析することによって、両者を相補的に活用することができる。すなわち、炭酸塩骨格の酸素同位体比などの化学分析とそれに含まれる有機物の化学分析により、より適切に古環境復元を実現できる可能性がある。しかしながら、微小領域の有機物分析の諸問題、サンゴ骨格中での有機物の初期続成作用や、微生物による分解作用などによる変質など、解明されなければならない課題も少なくない。

以上のことを踏まえ、本稿では、これまでのサンゴ骨格中の有機物に関する研究成果をまとめ、その発展性と問題点を整理しながら、サンゴ骨格中の有機物を活用した古環境解析の可能性を探る。

2. サンゴ骨格中にある有機物

2.1 サンゴ骨格の構造と有機物の関係

サンゴ骨格の全重量の約97%は無機炭酸塩の結晶(主にアラゴナイト結晶)が集積し、癒着してできたものであり(伊佐, 1992), 残りの約3%は有機物と水分の混合物から構成されている(Cuif *et al.*, 2004a; b)。骨格形成に関する有機物量は、骨格乾燥重量の約2~3%(Akita and Kawaguchi, 1948; Cuif *et al.*, 2004a; b)であるとの報告や、全炭素量として0.5 wt%以下である(Wainwright, 1962; Swart, 1981; Bak and Laane, 1987)という報告がある。また、サンゴ骨格中の有機物量は、生息場所によっても違いが見られる(Ingalls *et al.*, 2003)。以上のように、サンゴ骨

格中には有機物が存在していることが確かめられており、サンゴ骨格形成には無機炭酸塩だけではなく、有機物も重要な役割を担っていると考えられている。また、有機物は、サンゴだけではなく、骨格を形成する他の生物のバイオミネラリゼーションにとっても、骨格の構造や物性などを決めるための重要な物質であると考えられている(Mann, 2001)。サンゴ骨格は観察するスケールによって様々な構造をしていることが確認されることから、無機炭酸塩骨格と有機物の関係性を考察する上で、サンゴ骨格の微細な構造から全体の構造までを理解することは重要である。以下に、サンゴ骨格の全体構造、微細構造、そして炭酸塩と有機物の関係について述べる。

サンゴは、微小な生体の集まりと骨格によって構成されている。1匹の生体は、生体部分のポリプ(polyp)と骨格のコラライト(corallite)で構成されている(Fig. 1)。コラライトは主に、莖壁(the calyx wall), 底板(basal plate), 中軸(columella), 横隔板(dissepiment), 共同骨格(共骨; coenosteum), 隔壁(septum), 肋(costae), 萼(calice)で構成されている。サンゴの群体表面から1つの個体であるコ

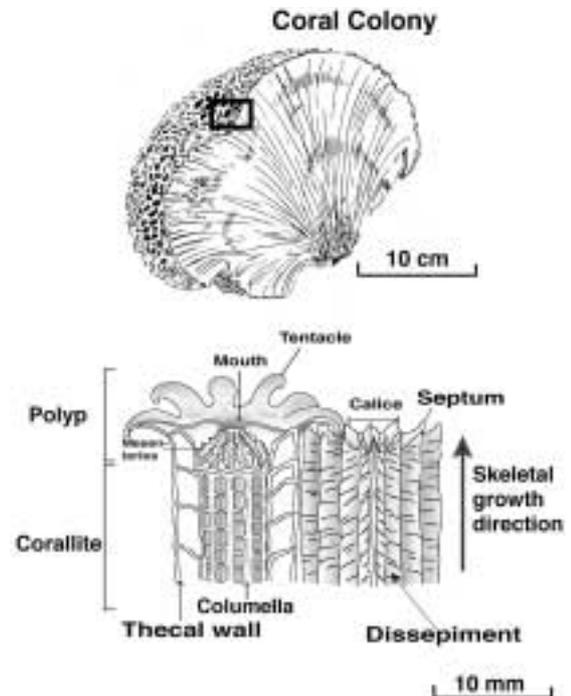


Fig. 1 Schematic diagram of coral skeletal structures. Coral consists of polyp and corallite of skeletal part. Modified from Watanabe *et al.* (2006).

している。また、有機物を取り除いた骨格とそうでない骨格の物性を調査した結果、有機物を含んでいる骨格は有機物を含んでいない骨格よりも遥かに高い圧力耐性や硬度を有していることがわかった (Mann, 2001)。Cuif and Dauphin (2005) は、有機物の鑄型によってサンゴの骨格構造が決まるという「Two step model」仮説を立てている。この仮説は、はじめに COC の部分が形成され、次に周りの繊維状結晶構造により骨格が肥大してサンゴ骨格を形成するという骨格成長モデルである。そのため、COC の部分を初期石灰化領域 (Early mineralization zone; EMZ) と名付け直している (Cuif and Dauphin, 2005)。以上のように、有機物は生物の骨格形成に関して重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。

2.2 サンゴ骨格中有機物の化学分析

サンゴのバイオミネラリゼーションは、造骨細胞と骨格の間にある calciblastic fluid (CF, ここでは造骨液と訳す) で満たされた calcifying space (CS, ここでは石灰化スペースと訳す) と呼ばれている場所で行われていると考えられている (たとえば, Clode and Marshall, 2002)。石灰化スペースに存在している有機物の化学組成を分析するためには、十分な有機物を集めることが必要である。しかしながら、石灰化スペースは幅が約数 μm の微小空間であり、その空間から有機物を抽出することは技術的に困難であるため、これまで十分に分析が行われてきていない。一方、骨格中の有機物は比較的多量に存在するため、サンゴのバイオミネラリゼーションに関する有機物の分析は、この骨格中の有機分子に注目して行われてきた。これまでの研究で、サンゴの骨格中には、多糖、タンパク質、脂質などの生物高分子有機物が含まれていることが確認されている (Hayashi, 1937; Young, 1971)。

多糖としては、キチンやムコ多糖がサンゴ骨格中から見つかっている。Wainwright (1962) は、脊椎動物の骨格中から検出されるキチンが、*Pocillopora damicornis* から少量検出されたことから、キチンが骨格形成に重要な役割を果たしているのではないかと考えた。しかしながら、キチンが検出されなかった種もあるので、どの程度キチンが骨格形成に関与しているかについては現在のところ不明である。一方で、ムコ多糖は多くのサンゴ種で認められている。ムコ多糖は、二糖の繰り返し単位からなる直鎖多糖である。Cuif *et al.* (2003) は、X 線吸収端構造解析法 (X-ray

absorption near edge structure spectroscopy; XANES) による分析をサンゴ骨格に対して行い、COC の部分に硫黄が局在していることを明らかにした。そして、その硫黄がアミノ酸由来のものではなく、ムコ多糖の側鎖に付随したものであるとした。ムコ多糖のバイオミネラリゼーションにおける詳しい役割は明らかになってはいないものの、硫黄鎖を含むムコ多糖は強い陰イオンの性質を持つコンドロイチン硫酸 (C-SO_4) の形で存在している。そのため、カルシウムイオンとの結合性が強く、炭酸塩骨格成長を促すと示唆されることから、ムコ多糖はバイオミネラリゼーションにおいて何らかの役割を果たしているものと考えられている (Constanz and Weiner, 1988; Cuif and Dauphin, 1998; 2005; Dauphin, 2001)。

タンパク質はサンゴ骨格中に含まれている主要な有機物であるため、骨格から抽出されたタンパク質のアミノ酸分析が盛んに行われてきた。サンゴ骨格中には、アスパラギン酸とグルタミン酸が多く含まれている (Cuif *et al.*, 1999)。また、藻類と共生するサンゴの骨格ではスレオニン (Thr) が平均 5.2% (可溶性有機物の全アミノ酸中に含まれる割合) を占めているのに対して、共生していないサンゴ骨格では平均 0.8% であり、両者の間でスレオニンの占有率に明確な違いが見られた。同様に、藻類と共生していないサンゴの骨格ではセリン (Ser) が平均 10.9% を占めるのに対して、共生しているサンゴの骨格では平均 4.7% しかなく、両者のセリン占有率にはっきりとした差異が認められた (Cuif *et al.*, 1999)。タンパク質のアミノ酸配列が判明すると、そのタンパク質の立体構造解析が可能になり、立体構造の観点からタンパク質の役割を解明できる可能性がある。サンゴ骨格中のアミノ酸配列の分析が行われているタンパク質は 3 つあるが、一次構造まで同定された唯一のタンパク質は、アザミサンゴの Galaxin である (Fukuda *et al.*, 2003)。Galaxin には、カルシウムイオン結合能は認められていないことから、石灰化に関与するタンパク質分子ではないと考えられている。このように、サンゴ骨格のバイオミネラリゼーションに関わるタンパク質は、未だに特定されていない (渡辺・遠藤, 2005)。今後、バイオミネラリゼーションに関わるタンパク質の同定・構造決定とその機能の解明が望まれている。

Isa and Okazaki (1987a) は、カルシウム結合核物質としてアラゴナイト結晶核粒子形成に関与している有機物を、水不溶性物質の中から抽出して研究を

行った。その結果、アラゴナイト結晶核粒子形成に関与している有機物は、リン脂質の一種（フォスファチジルセリン）を主な構成成分としているものであり、それがカルシウムイオン結合能を持つ結晶核物質であるとした。この物質はホスホグリセリドにセリンが付着した構造を持ち、細胞膜中に多く見られる。一般的にリン脂質は各末端に親水性・疎水性の官能基を持つために、水にリン脂質を分散させると、疎水性の部分が中心に集まり球状の形態をしたクラスター状の構造を形成する。その性質が、バイオミネラリゼーションに必要なカルシウムイオンなどの運搬に利用されていると考える研究者もいる (Mann, 2001)。

これまで多くの有機物がサンゴの骨格中から同定されてきた (Table 1)。中には、骨格中の有機物がバイオミネラリゼーションの視点から分析されているものもあるが、それらがどのような役割を果たしているのかは、未だに明らかにされていない。

2.3 サンゴ骨格微細構造中の無機元素と有機物の分布

近年、分析技術の進歩からマイクロメートルスケールで無機化学元素の分布を分析できるようになってきた。Allison *et al.* (2005) は、イオンマイクロプローブ分析を利用してサンゴ骨格を組織ごとに分析し、COCの部分は他の部分よりも高い Sr/Ca 比を示すことを明らかにした。その比は、高いところでは約10 mmol/mol、その他の部分では約8.7 mmol/molであった (Fig. 4)。また、彼らはイオンマイクロプローブでサンゴ骨格を部位ごとに分析し、COC部分の Mg/Ca, Ba/Ca 比が、ともに繊維状結晶のそれよりも高い比であることを示した (Allison and Finch, 2007)。Cuif *et al.* (2003) は、X線吸収端構造解析法 (XANES) を使用してサンゴ骨格中の化学物質分布をマイクロスケールで測定した結果に基づいて、骨格構造を形成する有機物シートが存在しており、それに炭酸塩結晶が集積するという過程が繰り返して骨格構造が形成されていると主張した。また、COC部分には有機物が高い濃度で存在しており、特に繊維状構造が形成されている箇所では、成長パターンに沿う有機物の分布に対応して、硫黄の濃度変動が認められた。彼らは、ラマン分光法 (Raman spectrometry) により、骨格内に存在している硫黄は鉱物中ではなく有機物中、中でも多糖中に存在していることを確かめた。

Meibom *et al.* (2004; 2005) は、従来の二次イオン質量分析器 (SIMS; Secondary Ion Mass Spec-

Table 1 Major organic compounds found in coral skeletons. Modified from Cohen and McConnaughey (2003), Ingalls *et al.* (2003), Fukuda *et al.* (2003), Puverel *et al.* (2005), Gupta *et al.* (2006; 2007) and Sowa *et al.* (unpublished data). Glu; glutamic acid, Asp; asparatic acid, Thr; threonine, Ser; serine.

<p>Protein</p> <p>Galaxin (<i>Galaxea fascicularis</i>), etc.</p> <p>Amino acids</p> <p>Glu, Asp, Thr, Ser, etc.</p>	<p>Carbohydrate</p> <p>mucopolysaccharide, chitin, etc.</p>
<p>Lipid</p> <p>Acidic phospholipids, etc.</p> <p>Fatty acids</p> <p>C18:0, C16:0, iso C15:0, anteiso C15:0, iso C17:0, C17:0, etc.</p> <p>Tetrapyrrol pigment</p> <p>Chlorophyll-a, Chlorophyll-b, etc.</p>	<p>Hydrocarbon</p> <p>< C₂₃, Pristane, Phytane, etc.</p> <p>Alcohol</p> <p>Sterol, 24-ethylcholest-5-en-3-ol (sitosterol)</p> <p>Phytol, Cholest-5-en-3-ol, 24-methylcholesta-5,24(28)-dien-3-ol</p> <p>C16-alcohol, C18-alcohol, etc.</p>

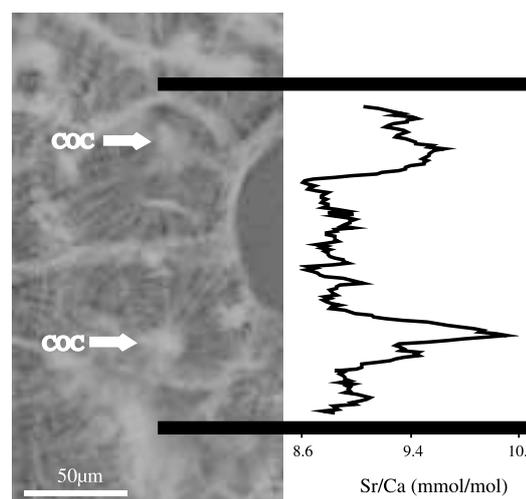


Fig. 4 The distribution of Sr in different part of coral skeletons. The SIMS traverse across the *P. lobata*, cut from a low-density annual band. The transmitted light micrograph on the left figure indicates the position of coral microstructures; centers of calcification (COC) and fibers. Modified from Allison *et al.* (2005).

trometer) よりも分解能が高い Nano-SIMS を利用して、サンゴの微細構造中の数十ナノメートルサイズのマグネシウムの分配を分析した。その結果、マグネシウム濃度は COC の部分で周辺よりも10倍程度高いことが示された。また、繊維状結晶の成長線と考えられている部分に沿って、マグネシウムの濃淡が繰り返されていることが明らかになった (Fig. 5)。彼らは、

マグネシウムを多く含む有機物があると主張した。バイオミネラリゼーションに関与する有機物の1つとして、硫酸化多糖が考えられてきたが (Constanz and Weiner, 1988; Cuif *et al.*, 2004a; b; Cuif and Dauphin, 1998; Dauphin, 2001), 以上の結果はその可能性を支持するものであろう。

ここに挙げた研究例のように、サンゴ骨格の微細構造の一部を形成する有機物の分析は、各種無機微量元素の分配に関する研究と併せて行われ始めている。今後、このような研究がさらに進展すると、サンゴ骨格形成に果たす無機微量元素と有機物の役割が具体的に解明されると期待される。

3. サンゴ骨格中の有機物を利用した古環境解析

3.1 サンゴ骨格中の有機物を利用したこれまでの古環境解析の試み

サンゴ骨格中有機物を利用した古環境解析研究として、アミノ酸のラセミ化に基づく年代測定が代表的なものである。特に、サンゴ骨格中の年輪がはっきりしない場合でも、他の年代測定法よりも精度よく年代を決定できるため、この方法は有効に活用されてきた (Goodfriend *et al.*, 1992; Nyberg *et al.*, 2001)。

Muscatine *et al.* (2005) は、共生藻をともなうサンゴ骨格中の有機物窒素同位体比の平均値が+4.09%であるのに対し、共生藻を所持していないものでは+12.28%であり、明白に異なることを示した。したがって、窒素同位体比はサンゴ生体の共生藻の有無を反映していると主張した。また、彼らは2億4,000万年前のサンゴ化石中有機物の窒素同位体の平均値が+4.66%であったことから、当時のサンゴ (*Pachytheclis major*) は既に共生藻を獲得していたと考えた。

Marion *et al.* (2005) は、サンゴ骨格中の有機物の窒素同位体比を、年輪に沿って分析した。その結果、1970~1971年の窒素同位体比が $10.7 \pm 0.4\%$ であった値が、年代を追って減少傾向を示し、1990年代の半ばには $3.5 \pm 0.4\%$ になった (Fig. 6)。人工肥料の窒素同位体比は $0.8 \pm 0.2\%$ であることから、彼らは窒素同位体比の減少傾向は人工肥料による同位体希釈によるものだと結論づけ、サンゴ骨格中有機物の窒素同位体比は人工肥料による河川水汚染の指標になると主張した。なお、この分析には800 mg程度と大量のサンプルが使用されているために、時間分解能は約3ヶ月と低くなっている。

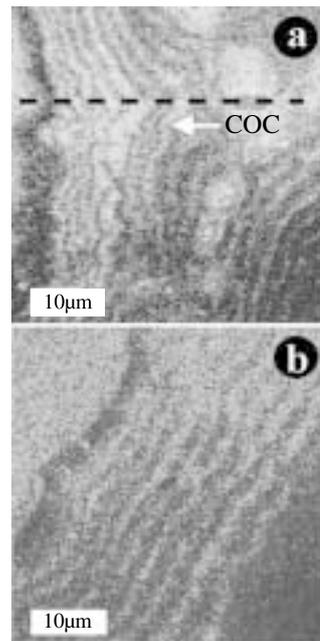


Fig. 5 The distribution of Mg in different parts of the *Pavona clavus* skeletons (a and b). Black colors correspond to relatively low Mg concentrations; white colors correspond to increasingly high Mg concentrations. Scale bars are 10 μm . White arrow indicates growth direction. Modified from Meibom *et al.* (2004) with permission of American Geophysical Union.

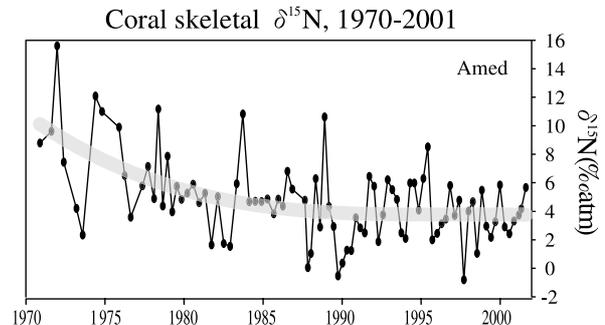


Fig. 6 Assessments of fertilizers in agricultural discharge by coral skeletal $\delta^{15}\text{N}$ values at Amed, Indonesia. Between 1970 and 2001 years, the successive decreasing trend of the Amed coral $\delta^{15}\text{N}$ reflects increasing fertilizer. Modified from Marion *et al.* (2005).

L-アスパラギン酸がカルシウムイオンとの相互作用が強く (Tong *et al.*, 2004), 酸性アミノ酸がサンゴ骨格中に多く存在していることから, Gupta *et al.* (2006; 2007) は酸性アミノ酸の一つであるアスパラ

ギン酸はサンゴ生体に直接由来し、サンゴ骨格形成に関与した有機物であると言及した。また、時間分解能が約1ヶ月になるようにサンゴ骨格の試料を採取し、アスパラギン酸濃度の変化を調べたところ、夏に濃度が高く冬に低くなることから (Fig. 7), アスパラギン酸濃度はサンゴの代謝活動の変化を反映している可能性があることが示唆された。しかし、全てのアスパラギン酸がサンゴのバイオミネラリゼーションに関与していたものかどうかについては議論の余地がある。なぜなら、前提としている L-アスパラギン酸とカルシウムイオンの相互関係は、カルサイト (calcite) とバテライト (vaterite) の2種の鉱物について確かめられただけであり (Tong *et al.*, 2004), サンゴ骨格を構成するアラゴナイトについては実験が行われていないからである。また、3.2で述べるように、サンゴ骨格中にはサンゴ生体以外の有機物の存在も確認されており、全てのアスパラギン酸がサンゴ生体のものであるかどうかは明確でない。

以上のように、サンゴ骨格由来の有機物の安定同位体比やアミノ酸を利用した古環境解析への試みは始まったばかりである。

3.2 サンゴ骨格中の有機物分析の諸問題

サンゴ骨格中の有機物を古環境解析に利用するためには、抽出した有機物が何に由来したものであるのか、抽出した有機物がどの程度初生的なものであるのかの2点を明らかにしなければならない。すなわち、有機物の起源と変質過程を知る必要がある。

サンゴ骨格中に存在する有機物 (たとえば, Table 1) は、サンゴ自身が合成し、骨格形成のために使用するものが多いとされる一方、周辺からの混入もあると考えられている。Isdale (1984) は、サンゴ骨格に紫外線を照射したときに認められる蛍光バンドは、海水中に存在しているフミン酸がサンゴ骨格中に取り込まれ沈着したものであると主張した。また、サンゴ骨格中には、菌類・バクテリアや共生藻から由来する有機物が混入しているとの見解もある (Duerden, 1902; DiSalvo, 1969; Bak and Laane, 1987)。さらに、続成過程によって生ずるクロロフィル由来のプリスタンやフィタンが現生のサンゴ骨格中に確認されていることから (Sowa *et al.*, unpublished data), サンゴ骨格中に存在する有機物には、サンゴ生体以外から由来するものがあることが伺える。したがって、特別な分離処理をせずにサンゴ骨格を分析すれば、サンゴ生体に直接由来する有機物と周りの海水から侵入し

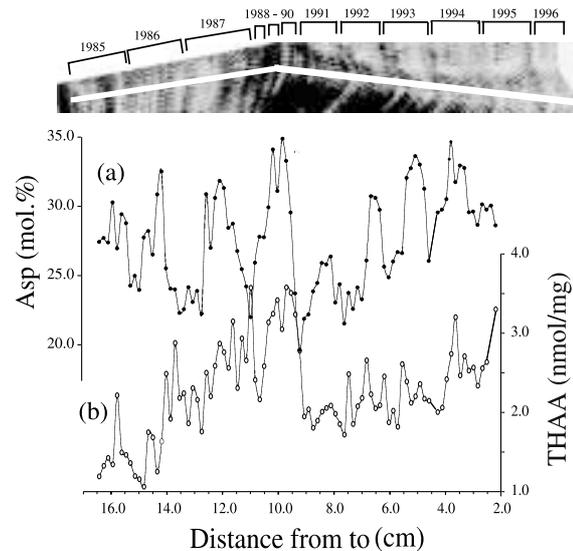


Fig. 7 Variation of aspartic acid (Asp) and total hydrolyzable amino acid (THAA) contents in a segment of a coral skeleton. The X-ray positive of the coral slab on top shows annual growth bands and growth disturbance. (a) Mole concentration profile of Asp relative to THAA (mol.%). (b) THAA profile (nmol/mg). Modified from Gupta *et al.* (2006).

た有機物など由来の異なる有機物を同時に分析することになる。Marion *et al.* (2005) や Gupta *et al.* (2006) は、サンゴ骨格に存在している全ての有機物を対象に分析を行った。それらの分析では、彼らはサンゴ生体に直接由来する有機物と周りの海水などから侵入した有機物を明確には区別しなかった。そのため、有機物の起源を明確にすることができなかった。現在のところ、研究室共通の分析方法が確立しておらず、研究室ごとに異なった分析方法が用いられるため、それぞれの研究データを比較することは困難である。

もしサンゴ骨格が形成されたときに同時に生成された有機物を分離して分析できれば、その有機物は古環境解析のための素材として最適である (Fig. 3)。なぜなら、その有機物は保護材となる骨格に閉じ込められることにより、その後の起源の異なる有機物の混入を防ぐからである (Ingalls *et al.*, 2003; Dauphin *et al.*, 2006)。サンゴ骨格は、造骨細胞と骨格成長面の間にある石灰化スペースで形成されると考えられており、そのスペースには骨格形成時に閉じ込められた有機物が存在する。この有機物は、サンゴ生体に直接由来した有機物である可能性が高い。もしそうであ

ば、サンゴ骨格に閉じ込められた有機物は、過去の環境変動を保持していることが期待される。

これまでになされてきた、サンゴ骨格に閉じ込められた有機物を取り出す研究の概要は以下のようなものである。サンゴ骨格中に閉じ込められていない有機物は、閉じ込められている有機物よりも、骨格との癒着性が弱いと予測されるために、化学処理によって前者を除去することができると考えられている (Shen and Boyle, 1988; Robbins and Brew, 1990; Gaffey and Bronnimann, 1993; Sykes *et al.*, 1995; Ingalls *et al.*, 2003)。それらの研究において、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) や水酸化ナトリウムを使用して化学処理をした後に、化学薬品でサンゴ骨格を脱灰すると必ず有機物が残存することがわかった。Sykes *et al.*

(1995) は、骨格に閉じ込められた有機物の存在場所を明示した骨格微細構造モデルを提案した。そして、化学処理とそのモデルから推測されるサンゴ由来の有機物を *intra-crystalline* (ここでは、結晶間有機物と訳す) と名付けた。Ingalls *et al.* (2003) は、8日間以上次亜塩素酸ナトリウムに浸した粉末状サンゴ骨格を脱灰して THAA (Total hydrolyzable amino acids; 全加水分解性アミノ酸) 量を測定した。その結果、最初の約8日間は THAA 量が減少したが、その後減少傾向がなくなり、一定の値となった。この結果から THAA に関しては、次亜塩素酸ナトリウム処理で骨格に閉じ込められていないものは除去できたものと結論づけた。一方で、Ingalls *et al.* (2003) は結晶間有機物を抽出して分析したところ、次亜塩素酸ナトリウムを利用した漂白処理では、外来と結晶間有機物の脂質は区別して抽出できない可能性があるとして報告している。

さらに、Ingalls *et al.* (2003) は結晶間有機物の安定性を調べるために、現生サンゴの年輪に沿って、TOC (全有機炭素量)、C/N 比、THAA 量の変化を分析した結果、結晶間有機物に数世紀間の高い保存性がある可能性を見いだした。Dauphin *et al.* (2006) は、サンゴ骨格の有機物を熱分解により分析した結果、炭酸塩の熱処理前に存在している有機物と、熱処理後に存在している有機物の組成等に違いがある可能性を報告した。そして、その違いから、炭酸塩骨格に閉じ込められている有機物は安定であると主張した。

古環境解析に適したサンゴ骨格中の有機物の種類に関する研究は始まったばかりに過ぎない。今後、どのような有機物が古環境解析に利用できるのか、それら

がサンゴ骨格中のどこに存在しているのか、どの程度初生的であるのかという問題を、同時に解決していくことが必要である。

4. サンゴ骨格中の有機物を利用した古環境解析の可能性

生物源有機物は、環境指標として古環境復元に広く利用されている (たとえば、Prahl and Wakeham, 1987)。現在では分析技術の発展により、有機物の分子レベルでの安定同位体比を用いた、生物源有機物を利用した古環境解析が盛んに行われるようになり、研究が進展してきている (たとえば、力石ほか, 2007)。一方で、3章で述べたように、サンゴ骨格中の有機物の研究では、古環境復元に利用できる有機物の分析は、まだあまり行われていない。その原因の1つには、有機物同定が主にバイオミネラル化の視点から行われてきたため、バイオミネラル化に関与しない有機物は、あまり研究対象とされなかったということが挙げられる。今後、サンゴ骨格中に存在する有機物から古環境解析や古気候復元に有用なバイオマーカーが検出されれば、サンゴの特徴である年輪形成と併用することで、高分解能で多様な古環境情報が得られる可能性がある。

サンゴ骨格中有機物のアルカン成分を分析することにより、海水の石油汚染が生態系に及ぼす影響を見積もることができる可能性がある。燃料オイルが3ヶ月にわたってカリブ海のサンゴ礁を覆ったときに採取した生体サンゴを分析した結果、サンゴは死滅していないものの、機能不全を起こしており、また石油由来の炭化水素を生体部中に濃縮していたことが明らかになった (Peters *et al.*, 1981)。この結果は、燃料オイル由来の炭化水素が骨格まで達していた可能性を示している。他の海域の骨格中炭化水素を分析した結果でも、人為的石油汚染を示す *n*-アルカン組成が見られた (Sowa *et al.*, unpublished data)。以上のことから、サンゴが年輪を刻みながら成長する特徴を利用して、時間軸に沿った有機物分析を行えば、サンゴが成長していた海域で過去にどの程度人為的石油排出によって汚染されていたのかを見積もることができると考えられる。

サンゴ骨格内有機物の窒素同位体比は、サンゴが棲息していた環境変動やサンゴの生理活動解明への手掛かりとなる可能性がある。Marion *et al.* (2005) や Muscatine *et al.* (2005) は、サンゴ骨格中の窒素同

位体比から、環境汚染やサンゴ生体の共生藻有無の評価ができることを明らかにした(3.1参照)。しかし、両研究ともに、窒素同位体比分析のために多くのサンプル量を要したために、サンゴ骨格を用いる利点である高時間分解能分析ができなかった。最近、微量での分析技術の改良が進み、これまでよりも2桁以上少ない、数mgのサンゴ骨格で窒素同位体比分析ができるようになった(大河内, 2007)。この分析手法を活用すれば、これまで困難であったサンゴ骨格中の窒素同位体比の季節変動を捉えることが可能になる。

その結果、サンゴの成長速度とその海域の栄養塩濃度変化との関係が明らかになる可能性がある。海水中の栄養塩濃度変化がサンゴの成長に影響を与えている可能性が指摘されている(Fabricius *et al.*, 2005)。この影響を評価するためには、河川水やサンゴ礁内海水とサンゴ骨格の高時間分解能を持つ窒素同位体比と河川水やサンゴ礁内海水の栄養塩濃度変化が有効である。それらの分析結果により、栄養塩濃度の変化がサンゴ骨格成長に与える影響を評価できるであろう。Marion *et al.* (2005) は、サンゴ礁に流れ込む河川の人工肥料汚染をサンゴ骨格の窒素同位体比から評価している(Fig. 7; 3.1)。サンゴ骨格が持っている高時間分解能を活用すれば、過去の河川環境汚染評価をより精密に行うことができる。

また、サンゴの白化現象頻度を正確な年代とともに推定できる可能性がある。サンゴの生体部分から共生藻が抜け出す現象を白化現象と呼んでいる。白化現象が起こる原因は、長期的な高水温化や低水温化等が考えられている(たとえば, Jokiel and Coles, 1990)。白化現象の後、正常に回復して成長を続けたサンゴ骨格の炭素同位体比を成長軸に沿って高時間分解能をとまう高密度分析をしたところ、白化現象が起きたときには炭素同位体比が顕著に低い値を示すことがわかった(Suzuki *et al.*, 2003)。彼らは、その原因をサンゴの代謝活動の低下によるものとした。代謝活動の変化はサンゴ骨格中の窒素同位体比にも反映していることが予想され、白化現象の前後と白化現象時では窒素同位体比に顕著に違いがある可能性がある。したがって、窒素同位体比と炭素同位体比の変動パターンを比較することによって、過去に起こった白化現象の原因をより詳細に評価でき、さらに現在の海洋で起こっているサンゴの白化現象が、過去のものとは比べて特異的であるかどうかを判別できることが期待される。

骨格中有機物の窒素同位体比により、過去のサンゴの生理活動を知ることができるかもしれない。Lesser *et al.* (2004) によって、サンゴ生体中にシアノバクテリアが共生し、サンゴ生体の中で窒素固定が行われている可能性が示された。また、サンゴは共生藻類を保持しており、共生藻類の活動がサンゴ骨格形成に寄与している(山里, 1991)。そのため、サンゴ骨格中の有機物の窒素同位体比を測定することによって、シアノバクテリアによる窒素固定の可能性や共生藻類の栄養塩消費などの生理活動を高時間分解能で評価できる可能性がある。

サンゴ骨格内の有機物に関する安定同位体比はこれまではバルクでのみ分析されてきたが、今後は分子レベルでの分析が行われることが期待される。たとえば、3.1で述べたように、サンゴ骨格中有機物の安定同位体比のバルク分析でも、環境汚染やサンゴの生理活動に起因する変化を見つけることができた。しかし、サンゴ骨格中には様々な有機物が存在しており、その各々が生成されたときの情報を固有に所有しているため、バルク分析では、それらの情報が混在した状態で分析され、分析結果の解釈が難しくなるという欠点を持っていた。この欠点を解決するためには、有機物の分子レベルでの安定同位体分析が強力な手法となる。たとえば、近年になりガスクロマトグラフ/燃焼/質量分析計(GC/C/IRMS)が開発され、個々のアミノ酸の窒素同位体比を、従来よりも簡便に行えるようになってきた(Merritt and Hayes., 1994; Metges *et al.*, 1996)。また、共生藻など特定の起源を持つバイオマーカーの安定炭素・水素同位体比が測定できれば、光合成による生物生産力や気候変動による降水量の変遷を明らかにできる可能性がある。このような分析手法では、バルク分析と異なり、個々の有機物からのデータが得られるため、より詳細な情報を読み取ることができる。さらに、様々な炭酸塩の古環境解析データを同一時系列で扱うことによって、より高時間分解能で詳細な古環境復元が行えるので、今後の地球環境がどのように変化していくのかを、従来よりも正確に予測していく手掛かりとなる。

サンゴのバイオミネラル化のメカニズム解明は、サンゴ骨格中の有機物を利用した古環境解析指標開発への大きな足がかりとなる。特に、生物生産や代謝活動にともなう同位体分別作用は、生物活動に敏感に対応するため、サンゴ骨格形成のために使用される様々な有機物の安定同位体比に影響を与えることが

予想される。したがって、バイオミネラリゼーションにおける有機物の生成・分解過程や利用の仕組みが判明すれば、サンゴ骨格中に存在している有機物の安定同位体比によって、サンゴの現在や過去の生理活動を直接的に知る手掛かりとなる。これまでの研究で、サンゴのバイオミネラリゼーションに関わるタンパク質（アザミサンゴの Galaxin, サオトメシコロサンゴの 47 kDa (タンパク質の質量単位) タンパク質やショウガサンゴの 55 kDa タンパク質) が見つかっている (Fukuda *et al.*, 2003; Puverel *et al.*, 2005)。これらのタンパク質は、サンゴのバイオミネラリゼーションにおける生理活動を記録している可能性がある。サンゴ骨格中のアミノ酸窒素同位体比により、サンゴのバイオミネラリゼーションに関わる生理活動を解析できる可能性がある。

サンゴ骨格中の有機物を利用した古環境解析は、大きく発展する可能性があり、これから新しい段階に入っていくものと考えられる。今後、サンゴ骨格を利用した古環境解析は、サンゴ骨格中の無機物と有機物の両方の視点から進めていくことが望まれる。

謝 辞

御助言・御協力いただいた北海道大学の沢田健講師、齋藤裕之博士、萩野恭子博士、天羽美紀博士、椎根大氏、川島龍憲氏、大森一人氏、菊地徹氏、山崎敦子氏、北海道大学技術部の野村秀彦氏、中村晃輔氏ならびに東京大学海洋研究所の白井厚太郎博士、海洋研究開発機構の高野淑識博士に感謝をいたします。また、東京大学海洋研究所の川幡穂高教授、産業総合研究所の鈴木淳博士、ならびに匿名の査読者には、本論文を査読していただき、有意義かつ適切な御助言を数多くいただきました。これらの方々に厚く御礼を申し上げます。

引用文献

- Allison, N. (1996) Geochemical anomalies in coral skeletons and their possible implications for paleoenvironmental analyses. *Marine Chemistry* **55**, 367-379.
- Allison, N., Finch, A. A., Newville, M. and Sutton, S. R. (2005) Strontium in coral aragonite: 3. Sr coordination and geochemistry in relation to skeletal architecture. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**, 3801-3811.
- Allison, N. and Finch, A. A. (2007) High temporal resolution Mg/Ca and Ba/Ca records in modern *Porites lobata* corals. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **8**, Q05001, doi:10.1029/2006 GC 001477.
- Akita, Y. K. and Kawaguchi, S. (1948) On the chemical composition of living reef coral. *Acta Zoologica Taiwanica* **1**, 67-80.
- Bak, R. P. M. and Laane, R. W. P. M. (1987) Annual black bands in skeletons of reef corals (Scleractinia). *Marine Ecology Progress Series* **38**, 169-175.
- Clode, P. L. and Marshall, A. T. (2002) Low temperature FESEM of the calcifying interface of a scleractinian coral. *Tissue & Cell* **34**, 187-198.
- Cohen, A. L., Layne, G. D., Hart, S. R. and Lobel, P. S. (2001) Kinetic control of skeletal Sr/Ca in a symbiotic coral: implications for the paleotemperature proxy. *Paleoceanography* **16**, 20-26.
- Cohen, A. L. and McConnaughey, T. A. (2003) Geochemical perspective on coral mineralization. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **54**, 151-137.
- Constanz, B. R. (1986) Coral skeleton construction: a physiochemically dominated process. *Palaios* **1**, 152-157.
- Constanz, B. R. (1989) The primary surface area of corals and variations in their susceptibility to diagenesis. *Reef Diagenesis* (eds. Schroeder, J. H. and Purser, B. H.), Springer-Verlag, Berlin, 53-75.
- Constanz, B. R. and Weiner, S. (1988) Acidic macromolecules associated with the mineral phase of scleractinian coral skeletons. *Journal of Experimental Zoology* **248**, 253-258.
- Cuif, J. P. and Dauphin, Y. (1998) Microstructural and physio-chemical characterization of 'centers of calcification' in septa of some recent scleractinian corals. *Palaontologische* **72**, 257-270.
- Cuif, J. P., Dauphin, Y., Freiwald, A., Gautret, P. and Zibrowius, H. (1999) Biochemical markers of zooxanthellae symbiosis in soluble matrices of skeleton of 24 Scleractinia species. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular &*

- Integrative Physiology* **123**, 269–278.
- Cuif, J. P., Dauphin, Y., Doucet, J., Salome, M. and Susini, J. (2003) XANES mapping of organic sulfate in three scleractinian coral skeletons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 75–83.
- Cuif, J. P., Dauphin, Y., Berthet, P. and Jegoudez, J. (2004a) Associated water and organic matters in coral skeletons: quantitative thermogravimetry coupled to infrared absorption spectrometry. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems* **5**, doi:10.1029/2004 GC000783.
- Cuif, J. P., Dauphin, Y. and Denis, A. (2004b) Biomineralization patterns in fibres and centres of calcification in coral skeletons. *Biomineralization (biom 2001) - Formation, Diversity, Evolution and Application* (eds. Kobayashi, I. and Ozawa, H.), Tokai Univ. Press, Kanagawa, 45–49.
- Cuif, J. P. and Dauphin, Y. (2005) The two-step mode of growth in the scleractinian coral skeletons from the micrometre to the overall scale. *Journal of Structural Biology* **150**, 319–331.
- Dauphin, Y. (2001) Comparative studies of skeletal soluble matrices from some Scleractinian corals and Molluscs. *International Journal of Biological Macromolecules* **28**, 293–304.
- Dauphin, Y., Cuif, J. P. and Massard, P. (2006) Persistent organic components in heated coral aragonitic skeletons—Implications for palaeoenvironmental reconstructions. *Chemical Geology* **231**, 26–37.
- DiSalvo, L. H. (1969) Isolation of bacteria from the corallum of *Porites Lobata* (Vaughn) and its possible significance. *American Zoologist* **9**, 735–740.
- Duerden, J. E. (1902) Boring algae as agents in the disintegration of corals. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **16**, 323–332.
- Fukuda, I., Ooki, S., Fujita, T., Murayama, E., Nagasawa, H., Isa, Y. and Watanabe, T. (2003) Molecular cloning of a cDNA encoding a soluble protein in the coral exoskeleton. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 11–17.
- Fabricius, K. E. (2005) Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* **50**, 125–146.
- Gagan, M. K., Ayliffe, L. K., Beck, J. W., Cole, J. E., Druffel, E. R. M., Dunbar, R. B. and Schrag, D. P. (2000) New views of tropical paleo-climates from corals. *Quaternary Science Reviews* **19**, 45–64.
- Gaffey, S. J. and Bronnimann, C. E. (1993) Effects of bleaching on organic and mineral phases of biogenic carbonates. *Journal of Sedimentary Research* **63**, 752–754.
- Gladfelter, E. H. (1982) Skeletal development in *Acropora cervicornis*: 1. Patterns of calcium carbonate accretion in the axial corallite. *Coral Reefs* **1**, 45–51.
- Goodfriend, G. A., Hare, P. E. and Druffel, E. R. M. (1992) Aspartic acid racemization and protein diagenesis in corals over the last 350 years. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56**, 3847–3850.
- Gupta, L. P., Suzuki, A. and Kawahata, H. (2006) Aspartic acid concentrations in coral skeletons as recorders of past disturbances of metabolic rates. *Coral Reefs* **25**, 599–606.
- Gupta, L. P., Suzuki, A. and Kawahata, H. (2007) Endolithic aspartic acids as a proxy of fluctuations in coral skeletons. *Journal of Geophysical Research* **112**, G01001, doi:10.1029/2006 JG000242.
- Hayashi, K. (1937) On the detection of calcium in the calicoblast of some reef corals. *Palao Tropical Biological Station Studies* **1**, 166–176.
- Isa, Y. (1986) An electron microscopic study on the mineralization of the skeleton of the staghorn coral *Acropora hebes*. *Marine Biology* **93**, 91–101.
- Isa, Y. and Okazaki, M. (1987a) Some observations on the Ca²⁺-binding phospholipids from scleractinian coral skeletons. *Comparative Biochemistry and Physiology* **87B**, 507–512.
- Isa, Y. (1991) Fine structure of skeletal growth ridge in some scleractinian corals. *In Mechanisms*

- and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems* (eds. Suga, S. and Nakahara, H.), Springer-Verlag, Tokyo, 167–174.
- 伊佐英信 (1992) サンゴの骨格形成の諸問題. 比較生理生化学, **9**, 73–87.
- Isdale, P. (1984) Fluorescent bands in massive corals record centuries of coastal runoff. *Nature* **310**, 578–579.
- Ingalls, A., Lee, C. and Druffel, E. R. M. (2003) Preservation of organic matter in mound-forming coral skeletons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67**, 2827–2841.
- Jokiel, P. L. and Coles, S. L. (1990) Responses of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperatures. *Coral Reefs* **8**, 155–162.
- Lesser, M. P., Mazel, C. H., Gorbunov, M. Y. and Falkowski, P. G. (2004) Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science* **305**, 997–1000.
- Mann, S. (2001) *Biom mineralization: principles and concepts in bioinorganic material chemistry*. Oxford University Press, Oxford. 156–183.
- Marion, G. S., Dunbar, R. B., Mucciarone, D. A., Kremer, J. N., Lansing, J. S. and Arthawiguna, A. (2005) Coral skeletal $\delta^{15}\text{N}$ reveals isotopic traces of an agricultural revolution. *Marine Pollution Bulletin* **50** (9), 931–944.
- Meibom, A., Cuif, J. P., Hillion, F., Constantz, B., Juillet-leclerc, A., Dauphin, Y., Watanabe, T. and Dunbar, R. B. (2004) Distribution of magnesium in coral skeletons. *Geophysical Research Letters* **31**, L23306, doi:10.1029/2004GL021313.
- Meibom, A., Yurimoto, H., Cuif, J. P., Domart-Coulon, L., Houlbreque, F., Constantz, B., Dauphin, Y., Tambutte, E., Tambutte, Y., Allemand, D., Wooden, D. and Dunbar, R. (2005) Vital effects in coral skeletal composition display strict three dimensional control. *Geophysical Research Letters* **33**, L11608, doi:10.1029/2006GL025968.
- Merritt, D. A. and Hayes, J. M. (1994) Nitrogen isotope analyses by isotope-ratio-monitoring gas-chromatography mass-spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **5**, 387–397.
- Metges, C. C., Petzke, K. J. and Hennig, U. (1996) Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric comparison of N-acetyl- and N-pivaloyl amino acid esters to measure ^{15}N isotopic abundances in physiological samples: A pilot study on amino acid synthesis in the upper gastro-intestinal tract of minipigs. *Journal of Mass Spectrometry* **31** (4), 367–376.
- Muscantine, L., Goiran, C., Land, L., Jaubert, J., Cuif, J. P. and Allemand, D. (2005) Stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of organic matrix from coral skeleton. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **102** (5), 1525–1530.
- Nyberg, J., Csapo, J., Malmgren, B. A. and Winter, A. (2001) Changes in the D- and L-content of aspartic acid, glutamic acid, and alanine in a scleractinian coral over the last 300 years. *Organic Geochemistry* **32**, 623–632.
- 大河内直彦 (2007) 赤潮の地球—クロロフィル分子化石と温室地球—. *Japan Geoscience Letters* **3** (2), 4–6.
- Peters, E. S., Meyers, P. A., Yevich, P. P. and Blake, N. J. (1981) Bioaccumulation and histopathological effects of oil on stony coral. *Marine Pollution Bulletin* **12** (10), 333–339.
- Prahl, F. G. and Wakeham, S. G. (1987) Calibration of unsaturation patterns in long-chain ketone compositions for palaeotemperature assessment. *Nature* **330**, 367–369.
- Pratz, E. (1882) Über die verwandschaftlichen Beziehungen einigen Korallengattungen. *Palaeontographica* **29**, 81–123.
- Puverel, S., Tambutte, E., Pereira-Mouries, L., Zoccola, D., Allemand, D. and Tambutte, S. (2005) Soluble organic matrix of Scleractinian corals: Partial and comparative analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology* **141B**, 480–487.
- 力石嘉人・柏山裕一郎・小川奈々子・大河内直彦 (2007) 生態学指標としての安定同位体比：アミノ酸の窒素同位体比分析による新展開. *Radioisotope, In press*.

- Robbins, L. L. and Brew, K. (1990) Proteins from the organic matrix of core-top and fossil planktonic foraminifera. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **54**, 2285–2292.
- Rollion-Bard, C., Blamart, D., Cuif, J. P. and Juillet-Leclerc, A. (2003) Microanalysis of C and O isotopes of azooxanthellate and zooxanthellate corals by ionmicroprobe. *Coral Reefs* **22**, 405–415.
- Shen, G. T. and Boyle, E. A. (1988) Determination of lead, cadmium and other trace metals in annually-banded corals. *Chemical Geology* **7**, 47–62.
- Shirai, K., Kusakabe, M., Nakai, S., Ishii, T., Watanabe, T., Hiyagon, H. and Sano, Y. (2005) Deep-sea coral geochemistry: Implication for the vital effect. *Chemical Geology* **224**, 212–222.
- Suzuki, A., Gagan, M. K., Fabricius, K., Isdale, P. J., Yukino, I. and Kawahata, H. (2003) Skeletal isotope microprofiles of growth perturbations in *Porites* corals during the 1997–1998 mass bleaching event. *Coral Reefs* **22**, 357–369.
- Swart, P. K. (1981) The carbon isotope composition of organic material in coral skeletons and its effect on early diagenesis. *Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium* **2**, 87–90.
- Sykes, G. A., Collins, M. J. and Walton, D. I. (1995) The significance of a geochemically isolated organic fraction within biominerals. *Organic Geochemistry* **23**, 1059–1065.
- Tong, H., Ma, W., Wang, L., Wan, P., Hu, J. and Cao, L. (2004) Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via L-aspartic acid inducing process. *Biomaterials* **25**, 3923–3929.
- Wainwright, S. A. (1962) An anthozoan chitin. *Experientia* **18**, 18–19.
- 渡辺俊樹・遠藤博寿 (2005) サンゴと甲殻類の外骨格における石灰化の分子機構。海洋生物の機能。竹井祥郎編，東海大学出版会，328–344。
- Watanabe, T., Reynaud, S., Cuif, J. P. and Dauphin, Y. (2006) Variation of geochemical signals in coral skeletons: Environmental change or biological processes?. *Paleontological Research* **10** (4), 359–374.
- Watabe, N. (1981) Crystal growth of calcium carbonate in the invertebrates. *Progress in crystal growth and characterization*. (ed. Ramplin, B.), Pergamon Press Oxford, 99–147.
- 山里清 (1991) サンゴの生物学。東京大学出版会，46–57。
- Young, S. D. (1971) Organic material from scleractinian coral skeletons-1. Variation in composition between several species. *Comparative Biochemistry and Physiology* **40B**, 113–120.