

解説

クロロフィルの分子化石ポルフィリンの地球科学[‡]

海洋研究開発機構 海洋極限環境生物圏領域

大河内 直彦^{*}, 柏山 祐一郎

クロロフィルの分解生成物であるポルフィリンは、さまざまな地質学的試料中に含まれており、太古の昔の環境復元に役立つツールである。クロロフィルの中心環は一連の分解プロセスを経た後、堆積物中で酸化バナジウムやニッケルなどを配位した金属ポルフィリン錯体に変質する。特にDPEPと呼ばれるポルフィリンは、多くの地質学的試料において最も多量に見出され、その構造上の類似性からクロロフィルaを主たる起源とする分子化石であると考えられている。ポルフィリンのアルキル基やexo環構造などの構造的特徴は、その起源化合物である各種（バクテリア）クロロフィルの構造を反映していると考えられている。したがって各種ポルフィリンの組成は、当時の光合成生物の組成について情報をもたらしてくれる。さらにポルフィリンを構成する炭素原子や窒素原子の安定同位体比を分析することによって、当時の海洋表層環境の復元に役立つさまざまな情報が得られる。本稿ではこのような研究方法の原理について概略を述べ、研究例として石油の根源岩であり白亜紀に堆積した「黒色頁岩」が形成された当時の海洋表層環境の復元について紹介する。

1. はじめに

現在の地球上では、年間12億トン近くものクロロフィルが合成されている。そのうち湖沼や海洋といった水界中で合成されているものは、その7割余りにあたる9億トン弱に達する¹⁾。湖沼や海洋の有光層において光合成生物によって合成されたクロロフィルは、生物体の死後、遺骸とともに重力沈降し海底面へと運ばれる。そのほとんどは時間をかけて分解されて最終的に無機化されるが、一部のものは海底堆積物中に埋没されそこで長らく保存される。保存の過程で、クロロフィルは化学的あるいは微生物学的な変質を受け、その構造は徐々に変化していく。

本稿で取り上げるポルフィリン (porphyrin) とは、図1(a)に示すような、環状テトラピロール構造をもつ化合物のことである。その構造がクロロフィルの中心環と類似していることから、クロロフィルが堆積物中で分解を受けて変質した化合物であろうと推定されてきた。このポルフィリン化合物群は、過去70年以上にわたる研究によって、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てきた。1930年代に化石ポルフィリンを堆積岩などから初めて見出したミュンヘン工科大学の

Alfred Treibs は、これらがクロロフィルやヘムといった生体分子と非常に類似した化学構造をもつことを指摘した^{2,3)}。Treibsは、ヘムやクロロフィルの有機合成の成果により1934年にノーベル化学賞を受賞したHans Fischerの研究室で助手を勤めていた人物である。この研究は、後に大きく

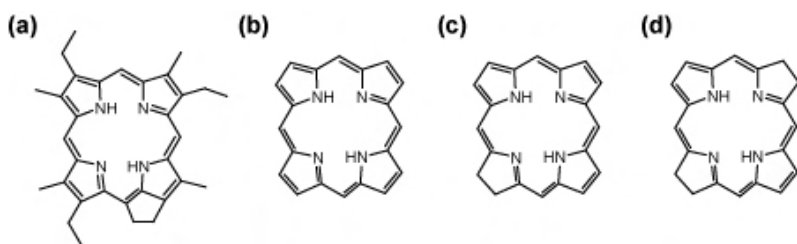


図1 (a) ポルフィリン、(b) ポルフィン、(c) クロリン (ジヒドロポルフィン)、(d) バクテリオクロリン (テトラヒドロポルフィン)

[‡] 解説特集「光合成研究 —化学からのアプローチ—」

^{*} 連絡先 E-mail: nohkouchi@jamstec.go.jp

発展する「バイオマーカー（生物指標性化合物）」という概念と有機地球化学という分野の原点と位置づけられ、ポルフィリンは有機地球化学の分野において長らく「レガシー分子」として君臨し続けている（国際有機地球化学会における最高の栄誉は、Treibsの名を冠した「Alfred Treibs Medal」である）。実際、過去の光合成生物の復元を目的としたとき、有用さと信頼度の高さという点においてこれに肩を並べるほどのツールは他に見当たらない。このようなことから、Treibs以降ポルフィリンをバイオマーカーとして用いた地球化学的な研究が長らく行われてきた。

ただし、地質学的試料中に分布しているポルフィリンは、類似した構造をもつ多種多様な化合物の集合体であり、Treibs が構造を決定した 2 種類のポルフィリンは、その中の代表的なものに過ぎない。試料中に含まれる数十種類もの微量なポルフィリンを個々に単離・精製し、その厳密な構造決定を行うことは非常に手間がかかるだけでなく、現代の科学でも高い分析技術力を必要としている。それゆえ、ポルフィリンを用いた地球科学的な研究は、高度な分析技術をもつ一部の研究グループに限定されてきた。近年の分析機器の高性能化やハイスループット化、オートメーション化などが発展してきたおかげで、ポルフィリンの地球科学的な応用研究のハードルは時代とともに徐々に下がりがつつある。最近になり筆者のグループでは、微量のポルフィリンの炭素および窒素安定同位体比を測定する技術を新たに開発し、その起源やそれを用いた過去の地球環境の復元に関してより深い考察が可能となった。本稿では、このような現状において、ポルフィリンの地球科学的な側面について概略を述べ、今後の研究の指針としたい。

これまで、各時代に優れた総説論文が書かれてきた^{4,9)}。また、1990 年には第 199 回アメリカ化学会年会において、当時のこの分野の最先端の研究者らが集い、「Porphyrin Geochemistry – The Quest for Analytical Reliability」という標題のシンポジウムが開催された¹⁰⁾。このシンポジウムの研究発表の内容は、アメリカ化学会が発行する *Energy & Fuel* 誌に特集号として収録されている。ポルフィリンの研究を行う人には、是非それらも併せて読むことをお勧めする。地質学的試料中に含まれるポルフィリンについて、これまで日本語で書かれた総説はなく、本稿は有機地球化学者以外の研究者にも読めるように配慮したつもりである。

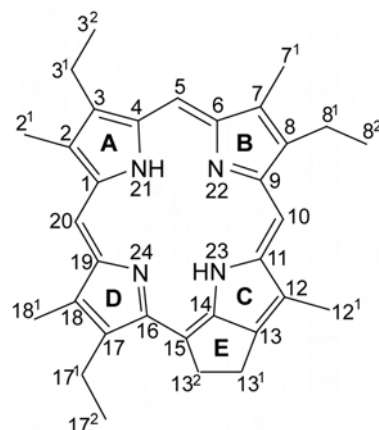


図2 ポルフィリンを構成する各炭素・窒素原子のIUPAC/IUB協定による位置番号

なお、本稿では地球科学的な応用に用いられるポルフィリンに限定するため、「ポルフィリン」という用語で統一するが、一般的には fossil porphyrin, petroporphyrin, geoporphyrin, metalloporphyrin, metalloalkylporphyrin, sedimentary porphyrin など様々な用語が用いられていることを付記しておく。

2. ポルフィリンの構造と命名法

本稿を理解するために、まずポルフィリンの構造とその命名法について簡単に解説しておこう。4分子のピロールがメチン橋を通して環状に結びついた構造は、「ポルフィン (porphin(e))」と呼ばれる(図1(b))。このポルフィンがアルキル基によって修飾されたものが、「ポルフィリン (porphyrin)」である。また、クロロフィルの中心環のように環状構造の一部が飽和したものをクロリン(あるいはジヒドロポルフィン、図1(c))、またバクテリオクロロフィルのようにさらに飽和したものをバクテリオクロリン(あるいはテトラヒドロポルフィン、図1(d))と呼ぶ。太古の昔に海底で形成された堆積岩や、それが変質することによって形成された石油・石炭などの地質学的試料中に見出されるものは、ごくわずかな例外を除きほとんどがポルフィリンである。

まず天然中に最も広く分布するクロロフィルであるクロロフィルaと、その分解生成物と考えられている deoxyphyloerythroetioporphylin (DPEP) を例にして、その化学構造とIUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry and Molecular Biology) による命名法について解説しよう。4つあるピロール環を左上から時計



図3 地質学的試料中からしばしば見出される主要なVOポルフィリン

(a) deoxyphyloerythroetioporphyrin (DPEP)、(b) etioporphyrin III (ETIO)、(c) rhodoporphyrin、(d) bicycloalkanoporphyrin (BiCAP)。

回りにA環、B環、C環、D環と呼び、C環の下に五員環をもつ場合は、それをE環と呼ぶ(図2)。テトラピロール骨格の炭素は、A環左下の炭素を1位し、その後時計回りに一周20位までとする。また骨格内部に位置する窒素は、その続きでA環から時計回りに数えていく。すなわち、A環の窒素は21位、B環は22位、C環は23位、D環は24位ということになる(図2)。また、骨格を修飾しているアルキル基の炭素は、C2¹、C3¹、C3²...といったようにそれが結合している骨格の炭素位の番号の右肩に、テトラピロール骨格に近い方から順番に数字を振っていく。

ポルフィリンあるいはクロリンといった構造は、生体内においてクロロフィル、ヘム、ビタミンB₁₂、シロヘムといった重要な機能をもつ複数の化合物の構造の一部を成している。ただし、天然中における合成量としては圧倒的にクロロフィルが多いので、地質試料中に含まれるポルフィリンの起源もクロロフィルがもっとも多いだろうと考えられてきた。実際に、多くの地質学的試料中にもっとも多く含まれるポルフィリンは、上述のDPEPである(図3(a))¹⁾。このポルフィリンの構造は、C2、C7、C12、C18位にメチル基、C3、C8、C17位にエチル基というアルキル基によって置換されると同時に、C環の下に五員環をもっている。この化合物は、正式には3,8,17-triethyl-13¹,13²-dehydro-2,7,12,18-tetramethylcyclopentaporphyrinと呼ぶべきだが、あまりにも長いので通称「DPEP」が広く用いられてきた。DPEPの化学構造は、クロロフィルやバクテリオクロロフィルの中心骨格に非常に類似している(図3(a))。この構造の類似性をもとに、この化合物の構造をはじめて明らかにしたTreibs(1936)は、DPEPがクロロフィルに起源をもつ化合物であると提唱した(当時はクロロフィルaとクロロフィルbしか知られていなかった)。DPEPから一部のメチル基が脱離したもの、あるいはDPEPのいずれかのエチル基が何らか

のプロセスでメチル基に置換されて炭素数が1つ減じたものは、炭素数を示して「C₃₁DPEP」と呼ばれることが多い。あるいは、たとえばC7位のメチル基が脱離した場合、C7-nor-DPEPというふうにも呼ばれることもある。

地質試料中に見出されるもう

ひとつの重要なポルフィリンの構造は、etioporphyrin III (ETIO) と呼ばれるのである(図3(b))。これもTreibsによって初めて記載されたもので、クロロフィルやDPEPに特徴的なE環をもたず、C2、C7、C12、C18位にメチル基、C3、C8、C13、C17位にエチル基をもつポルフィリンである。構造がヘムに類似していることから、ETIOはヘムが堆積物中で各種化学的・微生物学的作用を受けて生成されたものであると提唱された²⁾。その後の研究によると、ETIOもDPEP同様、炭素数32のものだけではなく、多様な炭素数をものが報告されている。地質試料中には、これ以外にもDPEPにベンゼン環が融合したロードポルフィリン(rhodoporphyrin、図3(c))と呼ばれるグループや、BiCAP (bicycloalkanoporphyrin、図3(d))と呼ばれるポルフィリン環の下部に複数の環状構造をもつグループも少なからず含まれている。2009年時点で、地質学的試料中から厳密に構造決定されたポルフィリンは、70種類以上に及んでいる。

ポルフィリン環はπ電子に富む共鳴構造をもっているため、クロロフィルと同じく光エネルギーの強い吸収をもっている。吸収の大部分は可視光領域にあり、400 nm付近(ソーレー帯)の強い吸収と、500-700 nm(Q帯)に弱い吸収をもっている。図4には、VO-DPEP(酸化バナジウム錯体)とクロロフィルaの吸収スペクトルを比較した。ポルフィリンの場合、A、B、C、D環がシンメトリーであるため、クロロフィルaのようにD環の一部が飽和している場合と比べて電子の局在化がなく、吸収帯がより高いエネルギー側(短波長側)に分布している(図4)。たとえば、クロロフィルaのソーレー帯の中心は430 nmにあるのに対し、酸化バナジウムを中心に配位したDPEPの最大波長は408 nm付近にある。ポルフィリンはQ帯の吸収が比較的弱いため、赤味を帯びた色をもっている。ちなみに「porphyrin」とは、ギリシャ語の porphyra (=purple)

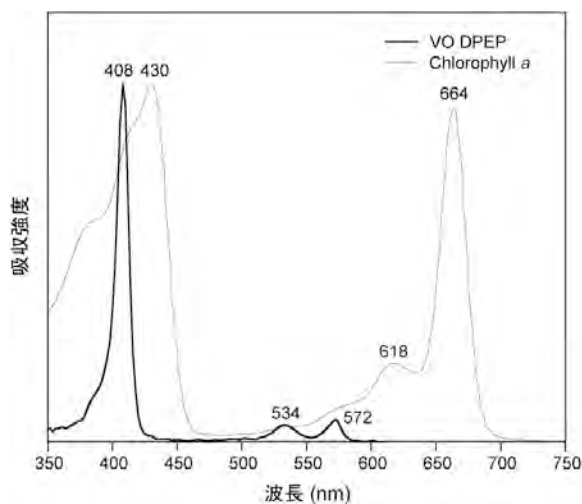


図4 クロロフィルaとポルフィリン (VO-DPEP) の吸収スペクトルの比較

を語源としており、鉄と結合したポルフィリン、すなわちヘムが深い赤色をしていたことに由来している。

ポルフィリン環の中心に配位する金属イオンについても簡単に述べておこう。地質学的試料中に含まれるポルフィリン環の中心には、多くの場合金属イオンが配位し金属ポルフィリン錯体を形成している⁸⁾。クロロフィルに配位する金属イオンはごく一部の例外を除いてマグネシウムイオン (Mg^{2+}) であり、またヘムに配位しているのは鉄イオン (Fe^{2+}) だが、地質試料中のポルフィリンにもっとも多量に見出される中心金属イオンは、酸化バナジウムイオン (VO^{2+}) とニッケルイオン (Ni^{2+}) であり、銅イオン (Cu^{2+}) がそれに続いている。それ以外に、比較的微量ながら鉄イオン (Fe^{3+})¹²⁾、ガリウムイオン (Ga^{3+})¹³⁾、マンガニオン (Mn^{3+})¹⁴⁾、亜鉛イオン (Zn^{2+})¹⁵⁾などがこれまで報告されている。熱力学的な安定性という観点からすると、酸化バナジウムイオンとニッケルイオンはいずれもポルフィリン環の中心に配位する金属イオンとして非常に安定であることが知られており¹⁶⁾、地質学的な記録と整合的である。しかしその一方で、理論的には酸化バナジウムイオンとニッケルイオンよりも安定と予測される金イオン (Au^{3+}) や白金イオン (Pt^{4+})¹⁷⁾を配位したポルフィリンが報告された例は現時点でない。なぜ地殻中に平均して 100-200 ppm しか含まれないバナジウムとニッケルだけがポルフィリン環に配位しやすいのかについて、現時点で明確な答えはない。またポルフィリン中のバナジウムイオンとニッケルイ

オンの存在比は、堆積環境中の酸性度、酸化還元電位、硫黄濃度が重要な要素だという指摘もある¹⁸⁾。

ポルフィリンの構造決定法についても簡単に解説しておこう。ポルフィリン環を修飾するアルキル基は、ポルフィリン環の電子の共役系にほとんど影響を及ぼさない。したがって、地質試料中に含まれるポルフィリンの構造決定には、吸収スペクトルの情報はあまり有用ではない。これまで、ポルフィリンの化学構造の決定の一助としてしばしば用いられてきたのが、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に直結した大気圧化学イオン化法質量分析計 (APCI-MS) である。通常強い分子イオンとその同位体イオンがみられるため、それらの情報からポルフィリンの炭素数と中心金属について推定することができる¹⁹⁾。さらにイオントラップ型の質量分析計を用いることにより、特定のフラグメントイオンの娘イオン、孫イオンを用いた構造決定の試みもなされてきた²⁰⁾。しかし、ポルフィリンの化学構造の厳密な決定には、ほとんどの場合において質量分析計では不十分である。これはポルフィリンが構造的に非常に安定であるため、フラグメントイオンがほとんど生じないからだけでなく、空間的に対象性の高い化合物であるためアルキル基の配置情報が得にくいことにもある。そのため、厳密な構造の決定には核磁気共鳴装置 (NMR: Nuclear Magnetic Resonance) あるいはX線回折装置が用いられてきた。

ニッケルポルフィリンおよび金属イオンを含まないポルフィリンの構造決定に関しては、 1H NMR が有用である。それに対し、地質試料中に見出されるポルフィリンのうち最も多い酸化バナジウムや銅の錯体は、それらの金属が常磁性であるため、NMRを用いて構造決定することは難しい。それらについては、メタンスルホン酸や濃硫酸で処理することによって、金属イオンを脱離してからNMRによる測定が行われることもある。ただし、VOポルフィリンから金属イオンを取り除く化学反応は収率が通常非常に低いため、地質試料から単離されるポルフィリンのように微量な試料の場合、その手法はあまり有効とは言い難い。地質試料中のVOポルフィリンやCuポルフィリンの構造決定には、最近進展著しい単結晶X線結晶構造解析法がもっとも有用である。これは、精製したポルフィリンをまず結晶化して、その結晶構造をX線の回折現象を応用して決定するというものである²¹⁻²³⁾。新しいポ

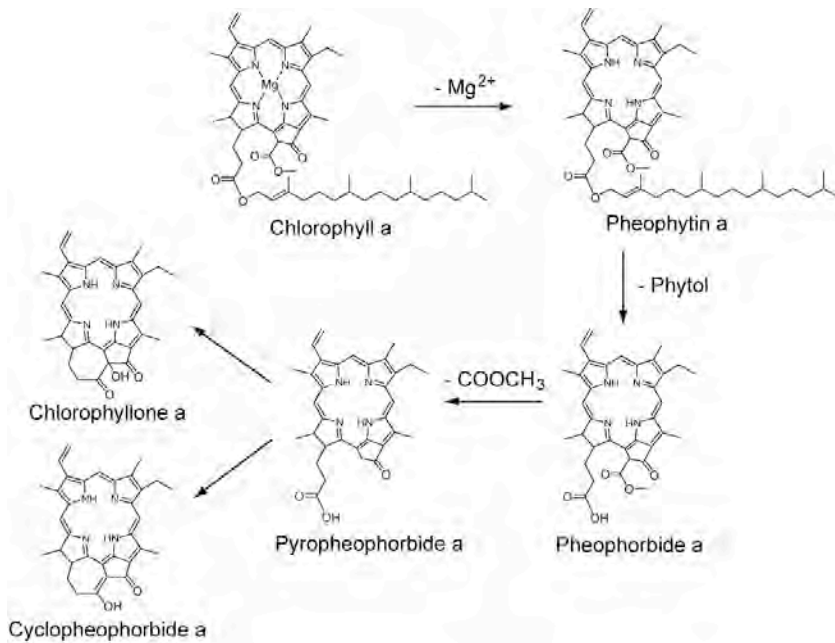


図5 現在の海底に形成されている堆積物中で起きているクロロフィルaの分解プロセスとその中間生成物

ルフィリンを記載する際には、NMRの化学シフトかX線回折による結晶データを示す必要がある

3. 地質試料中におけるポルフィリンの生成過程

環境試料や地質試料中に見られるポルフィリンが、クロロフィルから生成されるには、数多くの反応が関わる必要がある。ここではまず代表的な系として、まずクロロフィルaからDPEPに変質する場合について考えてみることにしよう。この変質の経路はAlfred Treibsによって提唱された経路で、一般に「Treibs scheme」と呼ばれるものである。このTreibs schemeでは、以下の8つの化学反応が起きなければならない。すなわち、

1. マグネシウムの脱離
2. フィトール側鎖の脱離 (エステル加水分解)
3. C13²位のカルボメトキシ基の脱離
4. C3位のビニル基の還元
5. C13¹位のケトン基の還元
6. C17-C18結合の酸化 (ポルフィリン環の形成)
7. C17³位の脱炭酸
8. 金属錯体の形成 (酸化バナジウムイオンやニッケルイオンの挿入)

ただし、天然環境中においてクロロフィルからポルフィリンが形成されるのに、必ずしも上で示した順序で反応が進むとは限らない^{24,25)}。またこれ以外の化学

反応を示唆する中間生成物も堆積物中から多数見出されている。

反応1では、クロロフィルの中心環からマグネシウムイオンが脱離して2個の水素原子によって置換された結果、フェオフィチン (pheophytin) が生成される (図5)。クロロフィルaからマグネシウムイオンが脱離したフェオフィチンaは、ソーレー帯の最大吸収が410nm弱にあり、褐色を呈する化合物である。このフェオフィチンはわずかだが光合成生物にも含まれていて、光化学系II系の反応中心において電子伝達に役立っている。とはいえ、水界中に見出されるフェオフィチンのほ

とんどは、クロロフィルの分解過程における中間生成物と考えられている。海洋や湖沼で見出される動物プランクトンの排泄物質中には、フェオフィチンがクロロフィルに対して多量に含まれており²⁶⁾、クロロフィルからマグネシウムイオンの脱離反応は、摂食というプロセスによって促進されるようだ。

陸上高等植物の場合、合成されたクロロフィルのほとんどは、落葉の前にクロリン環が開環した無色の化合物にまで酸化分解される²⁷⁾。したがって、水界の堆積物にまで移動してそこで保存される陸上高等植物起源のクロロフィル量は無視できるほど小さいと考えられている。実際、フェオフィチンなどの炭素と水素の安定同位体比を研究した Chikaraishi et al. (2007)²⁸⁾によると、榛名湖のような小さな湖沼においても、その湖底に沈殿しているクロロフィルやその分解生成物は、大部分が水界中の光合成生物に由来するもので、湖沼の周囲の陸上植物からの寄与はほとんどないと推定された。したがって、陸域から比較的離れた海域で形成された堆積物中に残されているポルフィリンは、基本的に当時の水界中の光合成生物によって合成されたものと考えてよいだろう。

現在の海底や湖底にたまっている堆積物を分析すると、上述の反応1から反応3までの中間生成物はふつうに見出すことができる¹⁾。すなわち、それらの反応は比較的素早く起きる。反応1および2の生成物はフェ

オフォルバイド (pheophorbide)、反応1および3の生成物はパイロフェオフィチン (pyropheophytin)、反応1、2、3による生成物はパイロフェオフォルバイド (pyropheophorbide) と呼ばれる (図5)。現在の堆積物中によく見出されるその他のクロロフィル誘導体としては、パイロフェオフォルバイドのD環の下に七員環をもつクロロフィロン(chlorophyllone)やシクロフェオフォルバイド(cyclopheophorbide)などがある (図5)。

それに対し、反応1-4による中間生成物 (mesopyropheophorbide) および反応1-5による中間生成物 (deoxomesopyropheophorbide) は軽度の続成作用を受けた堆積物から限定的に報告があるのみであり²⁹⁾、海洋や湖沼の表層堆積物中からは全く検出されない。ビニル基やケトンの還元が、自然環境中ではそう簡単には起きないことを示唆している。一方、反応1-6の中間生成物である deoxophylloerythrin (DPE) は、ある程度の続成作用を受けた堆積物試料から多量に見出すことができ、すでに²⁾によってその存在が報告されている。

反応8の金属錯体の形成は、従来反応3以降に起きると考えられていた。しかし筆者らは、およそ1万年前に網走湖で形成された堆積物中から、中心金属が銅イオン (Cu^{2+}) に置換されたバクテリオクロロフィル *e* を多量に見出している³⁰⁾。現時点で、天然中において銅イオンを含むバクテリオクロロフィル *e* は報告されていないので、おそらく堆積物中で二次的に生成されたものであろう。この場合、バクテリオクロロフィル *e* が分解の第一段階としてマグネシウムイオンが脱離してバクテリオフェオフィチン *e* になり、その直後に Cu^{2+} が挿入されたものと考えることができる。銅イオンを含む (バクテリオ) クロロフィルは比較的安定な化合物なので、一度銅イオンが挿入されると中間生成物として長期間存在しえることを示唆している。

こういった分解 (変質) 過程は、各クロロフィルによって少し異なっている。クロロフィル *a* のC3位のビニル基 ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) は他の芳香族有機化合物と化学反応を起こすことで、最終的に水素に置換されることもあると考えられている^{31,32)}。また、クロロフィル *b* のC7位やクロロフィル *d* のC3位のフォルミル基 ($-\text{CHO}$) も脱離して水素に置換されやすい。したがって、C3-nor-DPEPはクロロフィル *a* もしくはクロロフィル *d* 由来で、C7-nor-DPEPはクロロフィル *b* 由来と考え

られている。さらに、水界中においてクロロフィル *a* に次いで多量に合成されているクロロフィル *c* が分解する場合、17-C17'位の炭素-炭素結合が開裂することによってC17位のアルキル鎖が脱離し、最終的にC17-nor-DPEPが生成される。またE環が変質して、methylcyclopentanoporphyrin (MeCPP) と呼ばれる化合物が形成される場合もある^{24,33-35)}。

クロロフィル *a* は、上述の通りDPEPに分解されるが、理論上クロロフィル *b* やバクテリオクロロフィル *a* の分解によってもDPEPが生成される可能性がある。ただしクロロフィル *b* の場合、上述した通りC7-nor-DPEPが形成される可能性もあり、どちらが形成されるかは堆積環境次第だろう。また炭素数34以上のポルフィリンは、C8位がプロピル基、イソブチル基、あるいはネオペンチル基に、C12位がエチル基に、あるいはC20位がメチル基に置換されているバクテリオクロロフィル *c*、*d*、*e* 以外からは生じえない。したがって、炭素数34以上のポルフィリンが堆積物中から見出された場合、当時直上の表層水には還元環境が存在してバクテリオクロロフィル *c*、*d*、*e* を合成する光合成細菌 (緑色硫黄細菌と緑色非硫黄細菌) が生息していたと考えることができる。このような分解過程をひとつずつ丹念に考えていくと、(バクテリオ) クロロフィルとポルフィリンの間で、起源化合物-生成化合物の対応関係が見えてくる。

注意が必要なのは、個々の (バクテリオ) クロロフィルの分解速度は異なることが想定され、堆積物中に見出される各ポルフィリンの存在比が、当時海洋表層で合成されたその起源化合物の合成量比には一致しないという点である。堆積物中の各種ポルフィリンの存在比は、当時の光合成生物を還元するうえで、あくまでも目安として捉えるべきものである。とはいえ、堆積物中に残された各種ポルフィリンの分布がもつ情報は、一部を除いて化石として残されることのない光合成生物の貴重な情報を与えてくれる。同じく堆積物中に残されたステロイド、ホパノイド、アルケノンなど他の二次代謝物の分解生成物の断片的な情報と合わせるにより、さらに確かな復元が可能になるだろう。

4. ポルフィリンの安定同位体組成

地質学的試料に含まれるポルフィリンから得られる情報には、各種ポルフィリンの組成や存在比の他に、

ポルフィリンを構成する炭素、窒素、水素などの安定同位体組成、すなわち¹³C/¹²C比、¹⁵N/¹⁴N比、D/H比がある。ポルフィリンの安定同位体比は、それが合成された当時の環境情報や、同化プロセスの情報を記録しているため、ポルフィリンの起源であるクロロフィルを合成した光合成生物の生理生態を論じるうえで重要な示唆を与えてくれる。その情報は、さらに古環境の推定に用いられるのである。天然レベルの安定同位体組成を用いる方法論は、元来地球科学の分野で発展した経緯があり、生理学ではあまり一般的なものではない。しかし、地質学的な時間を経ても変質しない炭素および窒素同位体記録は、時として化合物組成の記録よりも確かな情報をもたらしてくれる重要な方法論である。

ポルフィリンの安定同位体比を解釈するためには、クロロフィルの生合成経路とそれとともなう安定同位体比の変化について理解しておく必要がある。ここでは、クロロフィルの生合成プロセスの詳細について深く踏み込みこまないが、炭素および窒素同位体比を解釈するうえで必要なことについて解説することにしよう。

クロロフィルの中心骨格をなすクロリン環部は、基本的にグルタミン酸から生成されるアミノレブリン酸2分子が縮合して形成されるポルフォビリノーゲンが、4分子縮合したものである。したがって、クロロフィルの中心骨格が変質してできたポルフィリンの炭素同位体比は、当然ながら当時の光合成生物が合成し

たグルタミン酸の炭素同位体比を強く反映したものになる。グルタミン酸の炭素骨格は、クエン酸回路の中間生成物であるケトグルタル酸に由来している。そしてそのケトグルタル酸の炭素骨格は、アセチルCoAやクエン酸回路における各種中間生成物の骨格の炭素に由来する。これらの炭素は、究極的には RubisCO (リブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ) の触媒により固定された溶存態二酸化炭素 (CO_{2aq}) に由来する。その同位体比は、基質である溶存態二酸化炭素の炭素同位体比の炭素同位体比だけでなく、RuBisCOの反応の際の顕著な同位体分別 (¹²Cの選択的な反応) を反映し、基質に対して20-30%ほど低い値をとる。

図6は、DPEPおよびクロロフィル a を構成する個々の炭素が、グルタミン酸のどの位置の炭素に起源をもつのかについて示したものである^{36,37}。例えば、DPEPを構成する32個の炭素は、グルタミン酸のC1位からC4位の炭素 (それぞれ8個ずつ) に起源をもち、C5位の炭素はまったく含まれていない。すなわち、DPEPの炭素同位体比は理論上、グルタミン酸のC1-C4位の炭素同位体比の平均値に一致することになる。

興味深いことに、ポルフィリン環のメチン架橋 (C5, C10, C15, C20位) の4つ炭素は、いずれもグルタミン酸のC1位の炭素、すなわちアミノ基の隣のカルボキシル基の炭素に由来している (図6)。この炭素はクエン酸回路の中間生成物である α -ケトグルタル

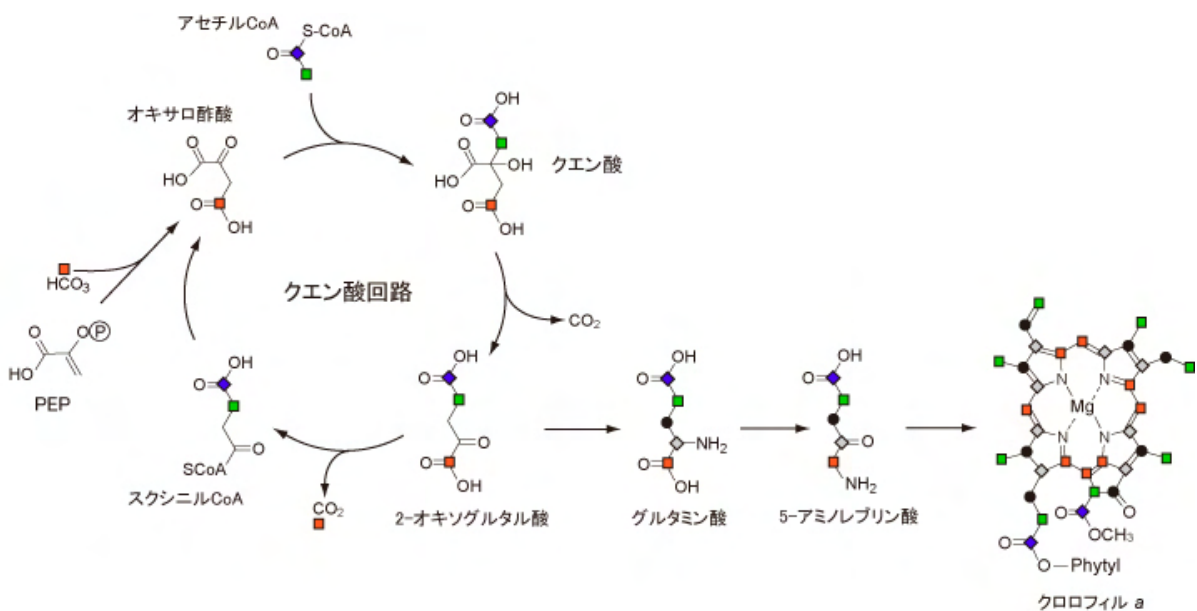


図6 クロロフィルの合成経路と、クロロフィルを構成する個々の炭素原子の起源の関係

酸のC1位の炭素に由来し、クエン酸回路をさらにたどっていくと、中間生成物であるオキサロ酢酸のC4位の炭素に由来することがわかる。PEP（ホスホエノールピルビン酸）カルボキシラーゼによるピルビン酸のβ-カルボキシル化によって生成するオキサロ酢酸が寄与する場合、オキサロ酢酸のC4位の炭素には、このβ-カルボキシル化のプロセスで固定される重炭酸イオンの炭素原子が混入する。通常の海洋では重炭酸イオン(HCO₃⁻)の炭素同位体比と溶解態二酸化炭素(CO_{2aq})の炭素同位体比を比べると、前者が10%ほど高い値をもっている³⁸⁾。したがって、クロロフィルにしろポルフィリンにしろ、メチン架橋を構成する4つの炭素原子の安定同位体比が測定できれば、光合成生物による重炭酸イオン同化の大まかな割合について推定することが可能である。実際にこの原理を用いて、筆者らは過去に生息した光合成生物の重炭酸イオンの平均的な同化率について推定した³⁷⁾。詳細は省くが、中新世（およそ1000万年前）の日本海で形成された堆積岩から、DPEP（主としてクロロフィル_a起源）とC17-nor-DPEP（クロロフィル_c起源）のメチン橋の炭素同位体比は、いずれも他の炭素原子の平均的な同位体比よりも約5%低い値を示した。このことから、当時の光合成生物によって固定された炭素が主として溶解態二酸化炭素であり、重炭酸イオンの同化はほとんど行われていなかったことが示唆された。

ポルフィリンの窒素同位体比は、光合成生物が生息していた当時の海洋表層水中における窒素サイクルについて重要な示唆を与えてくれる。クロロフィルの合成において、グルタミン酸がC5経路を経てアミノレブリン酸が生成される際、グルタミン酸のα位アミノ基がそのままアミノレブリン酸のδ位に転移する³⁹⁾。したがってアミノレブリン酸の窒素同位体比は、グルタミン酸の窒素同位体比を強く反映すると予測される。また藻類の研究によると、クロロフィルの窒素同位体比は細胞全体の平均的な窒素同位体比に比べて5%ほど低い値をもつことが知られている^{40,41)}。この同位体比の関係を利用して、それらを合成した藻類細胞の窒素同位体比を復元することが可能である⁴¹⁻⁴³⁾。この情報は、藻類が環境中から窒素を同化するプロセスに関わる情報を与えてくれる。

窒素は、海洋表層において生物生産を律速する重要な元素であるため、現在の海洋における窒素サイクルとそれにとまう安定同位体比の変化は詳しく研究さ

れてきた⁴⁴⁾。それに対して過去の海洋における窒素のサイクルの復元については、これまで研究の良い方法論がなく、あまり研究が進んでこなかった経緯がある⁴⁵⁾。したがって現在、ポルフィリンの窒素同位体比は、古海洋の窒素サイクルを知るうえで重要な証拠として採用されている。

5. ポルフィリンを用いた古環境解析

最初にも述べたとおり、地質試料中から見出されるポルフィリンは、指標性が強いことから優れた「バイオマーカー」とみなされてきた。ポルフィリンを古環境解析のための「バイオマーカー」として用いる長所は以下の7点に集約できる。すなわち、

1. その組成から当時の光合成生物群がある程度推定できる
2. ポルフィリンの起源化合物であるクロロフィルやヘムについては、合成・代謝・機能など様々な側面に関して深く研究されてきたため、基礎情報がそろっている
3. 窒素を含んでいるため、炭素だけでなく窒素サイクルの情報も得られる
4. 起源化合物であるクロロフィルやヘムは、北極から南極まで広く分布している
5. 地球史の比較的早い時期から現在に至るまで合成され続けてきた
6. 熱分解や微生物分解を受けにくく、地層中に長らく保存される
7. 堆積後に付加される可能性が低い

ただし、堆積岩など地質学的試料中に含まれるポルフィリンは、多様な形態で堆積物中に存在しているので注意が必要である。すなわち、遊離体として存在するものもあれば、エステル、エーテル、硫黄原子で架橋する形でケロジェン（堆積物中で形成される不溶性巨大分子）と化学結合しているものもある^{46,47)}。したがって、単純に有機溶媒で抽出されるものが全てを代表していない可能性があることについても注意を払う必要がある。

ポルフィリンを用いて古環境を推定する研究は、堆積物中に含まれるポルフィリン研究の一つの終着点である。ここでは、筆者らが行った白亜紀の黒色頁岩の分析結果を研究例として解説することにしよう。これまで行われてきた数多くの地質試料中におけるポルフィリン研究の中で、もっとも詳細に研究されたもの



図7 イタリア中部に産する「リベロ・ボナレリ」と呼ばれる有機物に富んだ黒色頁岩（中央左下から右上にかけて見られる厚さ1mほどの地層）

白亜紀中期の約9400万年前に形成された。場所によっては非常に厚く堆積しており、石油の根源岩となっている。

であり、特にその炭素・窒素安定同位体比を詳細に測定して考察した初めてのものである。

白亜紀には断続的に、「黒色頁岩」と呼ばれる有機物に非常に富んだ堆積岩が世界的に分布している⁴⁸⁾。その有機炭素濃度は、多いものでは50%を超えるものもあり、1億年以上にわたってこのように大量の有機物が無機化されずに残されていること自体驚くべきことである。現代文明を支える石油は、この時代に堆積した有機物が地下深くに埋没され、熱による変性を受けて形成されたものである。したがって、石油の根源岩である黒色頁岩の形成プロセスは、地質学者の間で長らく議論されてきた^{49,50)}。一般に、汎世界的に黒色頁岩が形成された地質学的な現象は「海洋無酸素事変 (OAE: Oceanic Anoxic Event)」と呼ばれている。この用語が示すとおり、海洋の熱塩循環が止まり

深層水が淀んで無酸素状態になったため、有機物の分解速度が低下し、有機物に富んだ堆積物が形成されたという考え方が広く信じられてきた。

筆者らは、海洋の物理的・化学的環境が変化した以上に海洋表層の生態系が大きく変わったことが本質的に重要であるに違いないと考え、この特殊な堆積岩の形成過程の研究に取り組んできた^{51,52)}。そこで、黒色頁岩中に含まれるポルフィリンを分析し、その情報から当時の海洋の一次生産者について考察した。ここでは、その成果について簡単にまとめてみたい^{41,42)}。

用いた堆積岩試料は、イタリア、アペニン山脈中に分布している「リベロ・ボナレリ」と呼ばれる黒色頁岩である(図7)。1 m ほどの厚さをもつ地層であるが、その中に含まれる有機炭素の濃度は最大26%に達する⁵³⁾。図8には、Niポルフィリン画分的高速液体クロマトグラムを示した⁵⁴⁾。その中には主なものだけでも20を超える多様なポルフィリンが含まれていることがわかる。個々の化合物の構造決定は、高速液体クロマトグラフィーの溶出物の分取を繰り返すことによつて、個々のピークをまず単離・精製した後、NMRを用いて行った^{42,54)}。

1990年代初頭まで、ポルフィリンの炭素および窒素安定同位体比は、個々のポルフィリンを単離・精製した後、封管法により燃焼して二酸化炭素、窒素、水としてガス化した後、デュアルインレット方式による安定同位体質量分析計に導入され測定されていた^{55,56)}。しかし実験操作の煩雑さに加えて、大量のポルフィリン試料を必要とするため、その測定例は限られていた。その後、より簡便かつ微量分析が可能な元素分析計/同位体質量分析計 (EA/IRMS: Elemental Analyzer /

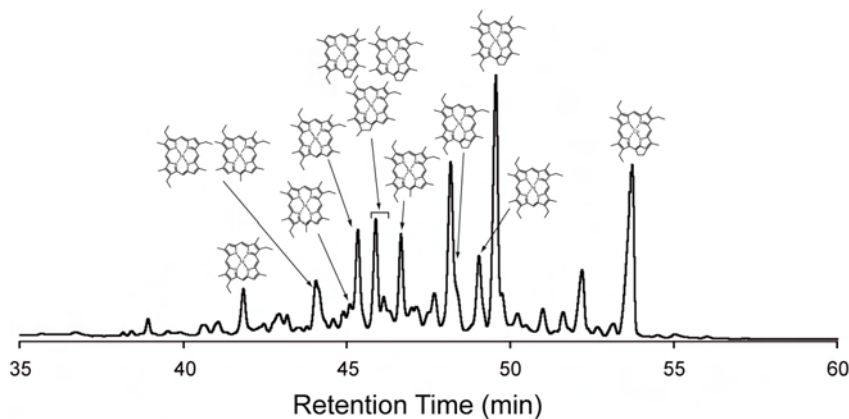


図8 白亜紀の黒色頁岩中から抽出された成分のうち、VOポルフィリンを含む画分的高速液体クロマトグラム

Isotope Ratio Mass Spectrometry) が開発・市販されたが、それでも精密な炭素同位体比測定の場合およそ 50 μg 、窒素同位体比測定の場合およそ 300 μg もの単離されたポルフィリンが必要となる。したがって、市販の EA / IRMSを用いてポルフィリンの炭素および窒素安定同位体比を測定しようとする、ポルフィリンがかなり多量に含まれている堆積岩であっても、数 kgあるいはそれ以上という大量の試料を

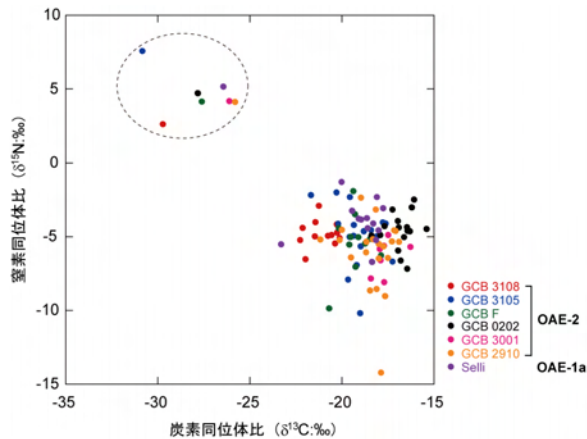


図9 白亜紀の黒色頁岩中から単離・精製された各種ポルフィリンの炭素および窒素安定同位体比

色の違いは試料の違いを表している。点線で囲った試料は、すべてetioporphyrinである。

抽出しなければならない。このことが足かせとなって、ポルフィリンの安定同位体の研究は、遅々として進まなかった。筆者らのグループではEA/IRMSを改造し、必要試料量を2桁以上減らしてスケールダウンに成功し、それによって、多数の堆積岩試料にこの分析法を応用することを実質的に可能にした⁵⁷⁾。

図9は、白亜紀の黒色頁岩から単離・精製された各種ポルフィリンの炭素および窒素同位体比の測定結果を示したものである。多くのポルフィリンは、炭素同位体比が $-18 \pm 3\text{‰}$ 、窒素同位体比が $-5 \pm 3\text{‰}$ という値をもっている。詳しいことは省略するが、このポルフィリンの窒素同位体比は窒素固定によって同化されたことを示唆し、当時の光合成生物が窒素固定経路を通して窒素を（直接的あるいは間接的に）同化していたことを強く示唆している。さらに、この黒色頁岩中からはDPEPが多量に見出されたことから、クロロフィルaをもちなおかつ窒素固定能をもつシアノバクテリアが主たる光合成生物であったと解釈した^{41,42)}。

興味深いことに、etioporphyrin III (ETIO)の安定同位体比だけが、他のポルフィリンの安定同位体比と大きく異なる値をもっている（図9）。すなわち、平均すると他のポルフィリンより9‰ほど高く（¹⁵Nに富み）、また炭素の同位体比は平均すると10‰近く低い（¹³Cに乏しい）。このことは、ETIOだけが他のポルフィリンとは起源が異なることを示している。詳細については省くが、従属栄養生物を起源とする生体物質の窒素同位体比は光合成生物よりも高いため^{28,58)}、動物起源のものも含むヘム起源のポルフィリン

はクロロフィル起源のポルフィリンに比べ高い窒素同位体比をもっていると予想される。したがって窒素同位体比の結果は、当初 Treibs が指摘したように、この黒色頁岩中に含まれるETIOがヘム起源であることを示唆する結果である。従来の研究では、DPEPからETIOへの分解経路が存在し、地質学的試料中に見出される多くのETIOがこの経路で生成されている可能性が指摘されてきた⁵⁹⁾。これは主として、天然中で合成されるヘムの量はクロロフィルの量に比べて5桁少ないのに対し、地質学的試料中から見出されるETIOの濃度がDPEPの濃度に比べて比較的大きい（1桁程度しか低くない）ことを説明するために提唱された分解経路である。今回、私たちが分析した白亜紀の堆積岩中から見出されるETIOの濃度も、DPEPの濃度より1桁低い程度である。しかし筆者らの安定同位体比の測定結果は、ETIOの多くがヘム起源であることを強く示唆しており、堆積岩中にETIOが比較的多量に含まれる原因は、DPEP→ETIOの変質が起きているからではなく、堆積物中におけるヘムの分解速度がクロロフィルに比べて遅いことに起因していると思われることができる。

地質試料中のポルフィリンの窒素と炭素の安定同位体比が詳細に測定された例は、現時点でこの白亜紀の黒色頁岩と、日本で採れる石油の根源岩である中新世女川層の2例しかない⁴³⁾。今後このような測定例が増えていくことにより、個々の時代の海洋表層の環境復元に役立っていくだろう。筆者らのグループでは、現在先カンブリア代の堆積岩中に残されたポルフィリンについても研究を開始している。実際、20数億年前の堆積岩からも微量のポルフィリンを見出すことができ、その寿命の長さには驚かされる。こういった研究の先に光合成の進化や、それと地球環境の進化とのつながりが浮かび上がってくることを筆者らは期待している。

6. おわりに

本稿で概説したように、クロロフィルの分解生成物であるポルフィリンの組成やその安定同位体比は、断片的にしか残されていない証拠をもとに過去の地球環境を復元するうえで、貴重な情報をもたらしてくれる。とはいえ、過去の地球環境を復元する地質学的方法論に完全なものではなく、本稿で解説したポルフィリンも決してその例外ではない。読者も気付かれたこ

と思うが、ポルフィリンを過去の光合成生物の分布や海洋表層環境を理解するツールとして応用するには、まだ数多くの不明な点や問題点を抱えている。しかしながら、地質時代における光合成生物という生命圏エネルギーの入口情報を得るツールとしては、現時点でポルフィリンの右に出るものがないのも事実である。

堆積物中に含まれるポルフィリンは、続成作用（堆積物中における分解作用）に極めて強い化合物ではあるが、それとでも、非常にゆっくりと時間とともにより小さな分子に分解していく。ポルフィリンといえども、あくまでも中間生成物にすぎないわけである。ポルフィリンがさらに分解する際、各メチン橋（-CH=）が開裂してマレイミド（maleimide）と呼ばれる化合物が生成される。マレイミドは、その起源であるポルフィリンのアルキル鎖や窒素安定同位体比の情報を保持しているため、地球科学的な研究に役立つと考えられている^{60,61}。たとえば、バクテリオクロロフィルc, d, eのC8位の特徴的なアルキル基は、そのままマレイミドのアルキル基として保存される。したがって、こういったプロピル基、イソブチル基、ネオペンチル基をもつマレイミドの存在は、当時そこにバクテリオクロロフィルc, d, eを合成した絶対嫌気性光合成細菌が存在していたことを示すものである。このことは、海洋表層の有光層部に還元環境が存在したことを示唆するものであり、大気中に酸素の蓄積の歴史を考えるうえで重要な制約条件となる可能性がある。さらに筆者らの研究によると、ポルフィリンが熱的にマレイミドに分解されるプロセスでは炭素同位体比の分別が起きないため、その炭素同位体比の情報も今後古環境情報として有用活用されることになるだろう。

先に解説したポルフィリンの分子内炭素同位体比情報（アイソトポマー）も、非常に高度な分析法を必要とするとはいえ、今後分析技術の進展とともに新たな視点を提供してくれるだろう。ポルフィリン分子の中に刻まれている生化学プロセスの情報を引き出し、古生物の生理生態に深く踏み込んだ知見が得られるに違いない。クロロフィルとその分解生成物であるポルフィリンを通して覗く地球の歴史に興味は尽きない。

謝辞

海洋研究開発機構の小川奈々子氏と力石嘉人氏は、筆者らの研究グループにおけるポルフィリンやその分

解生成物の安定同位体比の測定法の開発で成果を挙げ、またその結果の解釈について助言をいただいた。さらに、高野淑識氏、菅寿美氏には、実験に関して数多くのコメントとサポートをいただいた。筑波大学の野本信也教授にはポルフィリンの構造決定とマレイミドの標品合成について、また(株)リガクの城始勇氏には単結晶X線回折分析とその結果の解釈についてご教示いただいた。また東京大学の増田建准教授には本誌に出版の機会を、匿名の査読者には内容についてコメントをいただいた。以上の方々に深くお礼申し上げます。本研究は、海洋研究開発機構の運営費交付金を用いてなされたものである。

Received November 16, 2009, Accepted December 2, 2009,
Published December 31, 2009

参考文献

- Hendry, G. A. F., Houghton, J. D., and Brown, S. B. (1987) The degradation of chlorophyll - A biological enigma, *New Phytol.* 107, 255-302.
- Treibs, A. (1934) Chlorophyll- und Haminderivate in bituminösen Gesteinen, Erdölen, Erwachsen und Asphalten, *Ann. Chem.* 510, 42-62.
- Treibs, A. (1936) Chlorophyll- und Haminderivate in organischen Mineralstoffen, *Angew. Chem.* 48, 682-686.
- Baker, E. R., and Palmer, S. E. (1978) Geochemistry of Porphyrins, in *The Porphyrins*, Vol. 1 (Dolphin, D., Ed.) pp 486-552, Academic Press, New York, USA.
- Baker E. R., and Louda, J. W. (1986) Porphyrins in the geological record, in *Biological Markers in the Sedimentary Record* (Johns, R. B., Ed.) pp 125-225, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Callot, H. J. (1991) Geochemistry of chlorophylls, in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.) pp 339-364, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Callot, H. J., and Ocampo, R. (2000) Geochemistry of porphyrins, in *The Porphyrin Handbook Vol. 1* (Kadish, K. M. et al., Eds.) pp 349-398, Academic Press, New York, USA.
- Baker, E. W., and Louda, J. W. (2002) The legacy of the Treibs' samples, in *Alfred Treibs Memorial Volume: The Treibs-porphyrin concept after 65 years* (Prashnowsky, A. A., Ed.) pp 3-128, Gesamtherstellung, Germany.
- Keely, B. J. (2006) Geochemistry of chlorophylls, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* (Grimm, B. et al., Ed.) pp 535-561, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Freeman, D. H. (1990) ACS symposium on porphyrin geochemistry - The quest for analytical reliability, *Energy & Fuels* 4, 627.

11. Baker, E. R., Corwin, A. H., Klesper, E., and Wei, P. E. (1968) Deoxophylloerythroetioporphyrin, *J. Org. Chem.* 33, 3144-3148.
12. Bonnett, R., Burke, P. J., and Reszka, A. (1983) Iron porphyrins in coal, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 1085-1087.
13. Bonnett, R., and Czechowski, F. (1980) Gallium porphyrins in bituminous coal, *Nature* 283, 465-467.
14. Bonnett, R., and Czechowski, F. (1981) Metals and metal complexes in coal, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 300, 51-63.
15. Junium, C. K., Mawson, D. H., Arthur, M. A., Freeman, K. H., and Keely, B. J. (2008) Unexpected occurrence and significance of zinc alkyl porphyrins in Cenomanian-Turonian black shale of the Demerara Rise, *Org. Geochem.* 39, 1081-1087.
16. Buchler, J. W. (1978) Synthesis and properties of metalloporphyrins, in *The Porphyrins, Vol. 1* (Dolphin, D., Ed.) pp 389-483, Academic Press, New York, USA.
17. Manning, D. A. C., and Gize, A. P. (1993) The role of organic matter in ore transport processes, in *Organic Geochemistry – Principles and Applications, Chap. 25* (Engel, M. H., and Macko, M. A., Eds.) pp 547-563, Plenum Press, New York, USA.
18. Lewan, M. D. (1984) Factors controlling the proportionality of vanadium to nickel in crude oils, *Geochim. Cosmochim. Acta* 48, 2231-2238.
19. Rosell-Mele, A., Carter, J. F., and Maxwell, J. R. (1996) High-performance liquid chromatography-mass spectrometry of porphyrins by using an atmospheric pressure interface, *Am Assoc. Mass Spectr.* 7, 965-971.
20. Mawson, D. H., Walker, J. S., and Keely, B. J. (2004) Variations in the distributions of sedimentary alkyl porphyrins in the Mulhouse basin in response to changing environmental conditions, *Org. Geochem.* 35, 1229-1241.
21. Miller, S. A., Hambley, T. W., and Taylor, J. C. (1984) Crystal and molecular structure of a natural vanadyl porphyrin, *Aus. J. Chem.* 37, 761-766.
22. Boreham, C. J., Clezy, P. S., and Robertson, G. B. (1990) Diastereoisomers in sedimentary vanadyl porphyrins, *Energy & Fuels* 4, 661-664.
23. Kashiya, Y., Shiro, M., Tada, R., and Ohkouchi, N. (2007) A novel vanadyl alkylporphyrins from geological samples: a possible derivative of divinylchlorophylls or bacteriochlorophyll *a*? *Chem. Lett.* 36, 706-707.
24. Eckardt, C. B., Keely, B. J., Waring, B. J., Chicarelli, M. I., and Maxwell, J. R. (1991) Preservation of chlorophyll-derived pigments in sedimentary organic matter, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 339-348.
25. Keely, B. J., Prowse, W. G., and Maxwell, J. R. (1990) The Treibs hypothesis: An evaluation based on structural studies, *Energy & Fuels* 4, 628-634.
26. Harris, P. G., Carter, J. F., Head, R. N., Harris, R. P., Eglinton, G., and Maxwell, J. R. (1995) Identification of chlorophyll transformation products in zooplankton faecal pellets and marine sediment extracts by liquid chromatography/mass spectrometry atmospheric pressure chemical ionization, *Rapid Comm. Mass Spectr.* 9, 1177-1183.
27. Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H., and Krautler, B. (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves, *Plant Physiol.* 112, 1403-1409.
28. Chikaraishi, Y., Kashiya, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2007) Metabolic control of nitrogen isotopic composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies, *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 342, 85-90.
29. Keely, B. J., Harris, P. G., Popp, B. N., Hayes, J. M., Meischner, D., and Maxwell, J. R. (1994) Porphyrin and chlorine distributions in a Late Pleistocene sediment, *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 3691-3701.
30. Ohkouchi, N., Nakajima, Y., Okada, H., and Kitazato, H. (2005) Copper-chelated bacteriochlorophyll *e* homologues in sediment from an anoxic lake (Lake Abashiri, Japan), *Org. Geochem.* 36, 1576-1580.
31. Dinello, R., and Dolphin, D. H. (1981) Evidence for a fast (major) and slow (minor) pathway in the Schumm devinylation reaction of vinyl porphyrins, *J. Org. Chem.* 46, 3498-3502.
32. Kozono, M., Nomoto, S., and Shimoyama, A. (2002) The first experimental simulation of thermal transformation of chlorophylls into benzoporphyrins in sediments, *Chem. Lett.* 2002, 470-471.
33. Chicarelli, M. I. and Maxwell, J. R. (1986) A novel fossil porphyrin with a fused ring system: Evidence for water column transformation of chlorophyll? *Tetrahedron Lett.* 27, 4653-4654.
34. Callot, H. J., Ocampo, R., and Albrecht, P. (1990) Sedimentary porphyrins: Correlations with biological precursors, *Energy & Fuels* 4, 635-639.
35. Fookes, C. J. R. (1983) Identification of a homologous series of nickel (II) 15,17-butanoporphyrins from oil shale, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 1474-1476.
36. Ohkouchi, N., Nakajima, Y., Ogawa, N. O., Suga, H., Sakai, S., and 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.
37. Ohkouchi, N., Chikaraishi, Y., Kashiya, Y., Ogawa, N. O. (2009) Isotopomers of chlorophyll nuclei: Theories and an application, in *Earth, Life and Isotopes* (Ohkouchi, N. et al., Eds.) in press, Kyoto University Press, Kyoto, Japan.
38. Mook, W. G., Bommerson, J. C., and Staverman, W. H. (1974) Carbon isotope fractionation between dissolved bicarbonate and gaseous carbon dioxide, *Earth Planet. Sci. Lett.* 22, 169-176.
39. Mau, Y.-H.L. and Wang, W.-Y. (1988) Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*: study of the transamination mechanism using specifically labeled glutamate, *Plant Physiol.* 86, 793-797.

40. Sachs, J. P., Repeta, D. J., and Goericke, R. (1999) Nitrogen and carbon isotopic ratios of chlorophyll from marine phytoplankton, *Geochim. Cosmochim. Acta* 65, 1431-1441.
41. Ohkouchi, N., Kashiyama, Y., Kuroda, J., Ogawa, N. O., and Kitazato, H. (2006) The importance of diazotrophic cyanobacteria as primary producers during Cretaceous Oceanic Anoxic Event 2, *Biogeosciences* 3, 467-478.
42. Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kuroda, J., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2008a) Diazotrophic cyanobacteria as the major photoautotrophs during mid-Cretaceous Oceanic Anoxic Events: Nitrogen and carbon isotopic evidence from sedimentary porphyrin, *Org. Geochem.* 39, 532-549.
43. Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Tada, R., Kitazato, H., and 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, *Biogeosciences* 5, 797-816.
44. Wada, E., and Hattori, A. (1991) *Nitrogen in the Sea: Forms, Abundances, and Rate Processes*, CRC Press, Boca Raton, USA.
45. 大河内直彦 (2009) 古海洋の窒素サイクル：クロロフィルの窒素同位体比を用いた方法論について、月刊海洋、印刷中
46. Huseby, B. and Ocampo, R. (1997) Evidence for porphyrins bound, via ester bonds, to the Messel oil shale kerogen by selective chemical degradation experiments, *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 3951-3955.
47. Schaeffer, P., Ocampo, R., Callot, H., and Albrecht, P. (1993) Extraction of bound porphyrins from sulfur-rich sediments and their use for reconstruction of palaeoenvironments, *Nature* 364, 133-136.
48. Kuroda, J., and Ohkouchi, N. (2006) Implications of spatiotemporal distribution of black shales during Cretaceous Oceanic Anoxic Event-2, *Paleontol. Res.* 10, 345-358.
49. Schlanger, S. O., and Jenkyns, H. C. (1976) Cretaceous oceanic anoxic events – causes and consequences, *Geol. Mijnbouw* 55, 179-184.
50. 大河内直彦 (2003) 化石分子とその同位体の組成からみた白亜紀黒色頁岩の成因、化石74, 48-56.
51. Ohkouchi, N., Kawamura, K., and Taira, A. (1997) High abundances of hopanols and hopanoic acids in Cretaceous black shales, *Ancient Biomol.* 1, 183-192.
52. Kuroda, J., Ohkouchi, N., Ishii, T., Tokuyama, H., and 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.
53. Kuroda, J., Ogawa, N. O., Tanimizu, M., Coffin, M. F., Tokuyama, H., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2007) Massive volcanism as a causal mechanism for a Cretaceous oceanic anoxic event, *Earth Planet. Sci. Lett.* 256, 211-223.
54. Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2009) Nitrogen and carbon isotopic compositions of copper, nickel, and vanadyl porphyrins from the Cretaceous OAE black shales, in *Earth, Life and Isotopes* (Ohkouchi, N. et al., Eds.) in press, Kyoto University Press, Kyoto, Japan.
55. Hayes, J. M., Takigiku, R., Ocampo, R., Callot, H. J., and Albrecht, P. (1987) Isotopic compositions and probable origins of organic molecules in the Eocene Messel shales, *Nature* 329, 48-51.
56. Chicarelli, M. I., Hayes, J. M., Popp, B. N., Eckardt, C. B., and Maxwell, J. R. (1993) Carbon and nitrogen isotopic compositions of alkyl porphyrins from the Triassic Serpiano oil shale, *Geochim. Cosmochim. Acta* 57, 1307-1311.
57. Ogawa, N. O., Nagata, T., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2009) Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses, in *Earth, Life and Isotopes* (Ohkouchi, N. et al., Eds.) in press, Kyoto University Press, Kyoto, Japan.
58. Minagawa, M. and Wada, E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age, *Geochim. Cosmochim. Acta* 48, 1135-1140.
59. Corwin, A. H. (1960) Petroporphyrins. in *5th World Petroleum Congress New York, paper no. 5*, pp 119-129.
60. Grice, K., Gibbison, R., Atkinson, J.E., Schwark, L., Eckardt, C.B., and Maxwell, J.R. (1996) Maleimides (1H-pyrrole-2,5-diones) as molecular indicators of anoxygenic photosynthesis in ancient water columns, *Geochim. Cosmochim. Acta* 60, 3913-3924.
61. Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., Satoh, M., Nomoto, S., and Ohkouchi, N. (2008) A compound-specific isotope method for measuring the stable nitrogen isotopic composition of tetrapyrroles, *Org. Geochem.* 39, 510-520.

Geochemistry of Porphyrins as Molecular Markers of Chlorophylls

Naohiko Ohkouchi* and Yuichiro Kashiyama

Institute of Biogeosciences

Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology