

白亜紀木片化石の抵抗性高分子を構成する結合態脂肪酸 および脂肪族アルコールの組成分布 —分子古生物学的指標の検討—*

中村英人**・沢田 健**

(2007年7月30日受付, 2007年11月9日受理)

Abstract

The chemical compositions of woody fossil fragments collected by picking manually and density centrifugation from sandstones of the Lower Cretaceous Yezo Group in Oyubari, central Hokkaido, Japan were analyzed by KOH/methanol hydrolysis (saponification) after solvent extraction. Organic compounds bound in macromolecules of the woody fragments with ester bonds, obtained by saponification, were mainly composed of short-chain (C_{14} to C_{18}) fatty acids and series of *n*-alkanols ranging from C_{12} to C_{28} homologues. These ester bound constituents are attributed to moieties of polyester parts of selectively preserved resistant macromolecule like cutin or suberin. Even carbon-number predominance was observed in both compounds, which indicated that biological components were well preserved. The bound fatty acids showed similar distribution patterns among all samples, indicating that these moieties might have been altered by strong diagenetic processes. On the other hand, the distribution patterns of *n*-alkanols significantly varied. In particular, those of long-chain ($>C_{20}$) *n*-alkanols varied possibly depending on plant taxonomy. Thus, we suggest that these parameters are strongly useful as molecular paleobiological indicators for chemotaxonomic analyses. Also, the distributions of short-chain *n*-alkanols and the ratios of short to long-chain homologues are presumably useful indicators for diagenesis, taphonomy and environment.

1. はじめに

植物化石は過去の地質時代における多様な植物の存在と、その進化を具体的に示す貴重な物的証拠である。地質時代の堆積物中から発見された微小な花粉化石や数 m を超す大型材化石から、過去の植物の形態・生態的情報を得て、陸上植物の系統・進化や陸上古環境・古気候を復元する研究などが行われている。しかし、地質時代の植物化石、とくに形態をよくとどめた葉・茎(幹)・種子

などの大型植物化石の産出は限られていて、そのわずかな記録の断片から推定せざるを得ない。一方、地質時代の堆積物中でも、もとの植物の形態が判らないほど細くなった植物片、とくに炭化した木片(木質部の破片)は普通に含まれていて容易に見出すことができる。このような木片化石に含まれる有機物成分を調べることで、もとの植物種を同定するための有用な古生物化学的情報が得られる可能性がある。

近年、大型植物化石の有機地球化学分析によ

*Distributions of fatty acids and alcohols bound in resistant macromolecules of the Cretaceous woody-fragment fossils - search for molecular paleontological indicators -

**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

e-mail; hideton@ep.sci.hokudai.ac.jp, Tel : 011-706-3683, Fax : 011-706-3683

Hideto Nakamura and Ken Sawada: Department of Natural History Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University N 10 W 8, Kita-ku, Sapporo 060-0810, JAPAN

り、起源となる植物の分類や、続成変化の過程やタフオノミー、生息していた当時の古環境・古気候復元の研究が行われている (Lockheart et al., 2000; Otto and Simoneit, 2001; Tu et al., 2003; Hauteville et al., 2006)。それらの研究は、陸上植物に由来するテルペノイドなどのバイオマーカーが用いられている。とくに、バイオマーカーによって大まかな植物の分類群 (タクサ, taxa) を推定・同定する化学分類 (Chemotaxonomy) が注目されている (Otto and Simoneit, 2001)。しかし、化石中のバイオマーカーは、有機溶媒で抽出される低分子量の遊離態分子として化石の表面などに付着して残っている成分であり、高い続成作用を受けた化石体ではほとんど失われていることが多い。また、遊離態成分なので、堆積物中を移動し、化石が本来もたない外来の成分が付加されている可能性を否定できない。一方、大型植物化石や植物片化石の大部分は、非抽出性かつ疎水性の高分子有機物からなる。この化石‘本体’を構成する高分子有機物は、もとは植物生体の表皮や樹皮などの硬い組織に由来する抵抗性高分子 (resistant macromolecule あるいは resistant polymer) が、選択的に保存されたものである。ただし、厳密にいうと植物化石を構成する高分子有機物は、生体時の抵抗性高分子だけではなく、続成作用で後から形成された部分も含まれると考えられている (Almendros et al., 1999; Gupta et al., 2007)。植物生体が持つ抵抗性高分子は、タクサによってその構成要素である単量体 (monomer) の組成が異なることが知られており、起源となる植物の化学分類情報を与える有力な指標として提案されている (Abbott et al., 1998; Pastorova et al., 1998; Arai et al., 2003)。さらに、生育時の周辺環境や気候条件を記録したまま保存されている可能性があり、陸上の古環境・古気候プロキシにもなり得ると期待される。しかしながら、植物片化石においては抵抗性高分子の研究はほとんど報告例がない。

本研究では、北海道下部白亜系蝦夷層群のタービダイト砂岩から産出した細粒の木片化石に着目して、有機地球化学分析を行った。砂岩中の木片化石の一個体を個別に分離、あるいはほとんどすべての木片化石を回収するように網羅的に分離して、それらをアルカリ加水分解し、得られた主要

成分である脂肪酸および脂肪族アルコールについての基礎的なデータ記載を行った。また、抽出性の遊離態バイオマーカーの分析も行った。それらの結果から、木片化石中の抵抗性高分子がもつ、化学分類や続成作用・タフオノミーなどを解析するための分子古生物学的指標としてのポテンシャルを評価した。また、有機溶媒抽出、高温でのリフラックス抽出、けん化を連続的に行う実験を行い、化石中の遊離態、結合態分子の存在形態について検討・考察した。

2. 試料と分析

2.1 試料

北海道中央部大夕張地域 (Fig. 1) の天狗ノ沢 (てんぐのさわ) 沿いに露出する下部蝦夷層群スーパーロ川層奥境ノ沢砂岩泥岩部層の岩石試料を採取した。奥境ノ沢砂岩泥岩部層は、大夕張地域では部層の中部に砂岩層を頻繁に挟み、砂岩はタービダイト性で植物片を多く含む (Takashima et al., 2004)。とくに、植物片が顕著に見られた3地点 (TNG 15, TNG 17, TNG 20; Fig. 1b) の河底露頭から砂岩試料を採取した。TNG 15 および TNG 17 では近接する泥岩試料も採取した。本研究における試料採取地点の層序区分は Takashima et al. (2004) に従った。

2.2 木片化石の分離

採取した岩石試料に含まれる木片化石は黒色で不透明の断片的で、細長い枝のような形状や、円磨された矩形～円形の外形のものが確認できた (Table 1, Fig. 2)。岩石試料は乾燥してハンマーで表面部分を除去した。

本研究では、ピッキングと比重分離の二通りの方法を用いて木片を分離した。ピッキングでは、ハンマーとタガネを用いて岩石試料を整形し、複数の植物片を露出させた。その中から比較的大きめの断片 (1~4 cm 程度) を選び、それぞれをナイフとピンセットを用いて、砂岩のマトリックスを含まないよう手作業で丁寧に分離した。なお、T 15 F 1 と F 2 および T 17 F 1 と F 2 はそれぞれ同一の岩石試料から分離した異なる植物片である。ピッキングで得た木片化石試料は単一の植物に由来する。一方で、岩石試料中に含まれる木片化石

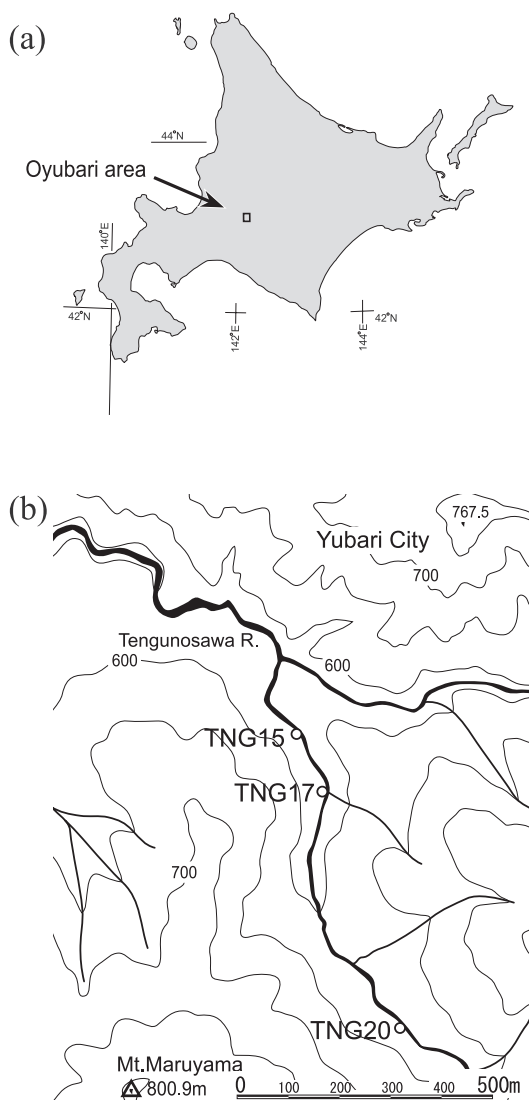


Fig. 1. (a) Location of study area, and (b) sampling locations at the Tengunosawa River route in the Oyubari area, central Hokkaido, Japan.

を網羅的に回収する方法として比重分離を行った (Sawada, 2006)。粉碎した砂岩試料 20 g を 6 N HCl に 60℃ で 4 時間浸し、炭酸塩鉱物を除去した。洗浄後、50 ml 遠沈管に入れ、室温で比重 2.0 に調整した臭化亜鉛 (ZnBr) / 希塩酸溶液 (0.5 N HCl) を加えて攪拌した。その後、遠心分離 (1500 ×g, 15 分, 室温) を行い鉱物粒子と木片を分離した。浮上している木片を別の遠沈管に移して蒸留水で洗浄し、再び比重分離して木片試料を得た。

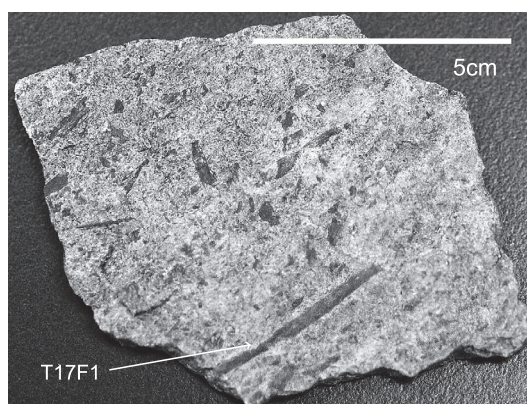


Fig. 2. A photograph of a sandstone collected from TNG 17, which contains numerous plant fragments. Scale bar is 5 cm.

2.3 抽出・分離・加水分解 (けん化)

本研究における木片化石および泥岩試料からの有機成分の抽出、分離、加水分解のフローチャートを Fig. 3 に示した。粉碎した泥岩試料 (T 15 M, T 17 M) 30 g, 木片化石試料は全量 (50~360 mg) を用いた。木片化石試料はメノウ乳鉢で粉碎した。有機溶媒による抽出法は Sawada et al. (1996) に従った。岩石粉末試料および木片化石の粉末試料を、メタノール (MeOH), MeOH/ジクロロメタン (DCM) (1/1, v/v), DCM で 15 分間, 6 回ずつ超音波抽出した。抽出物はロータリーエバポレーターで濃縮し、窒素ガス気流下で乾固した。

溶媒抽出後の残渣を次のような方法でアルカリ加水分解 (けん化) 処理を行った。抽出残渣物を 20 ml ガラス管に入れ、1 N 水酸化カリウム (KOH) / MeOH を 10 ml 加えた。管内の空気を窒素に置換した後、ガラス管を封管し、110℃ で 3 時間反応させた (リフラックス)。反応後、溶液を遠沈管に移して遠心分離を行った後、上澄みを別のフタ付き遠沈管に移し蒸留水 5 ml を加えた。ヘキサン/ジエチルエーテル (9/1, v/v) 15 ml を加えて振とうし、上層を 50 ml フラスコに移す液-液分配の操作を 3 回繰り返した。その後、エバポレーターを用いてフラスコ内の溶媒を乾固して中性画分を得た。液-液分配後の残液に 1 N 塩酸 10 ml を加え、DCM 15 ml により 3 回抽出して酸画分を得た。

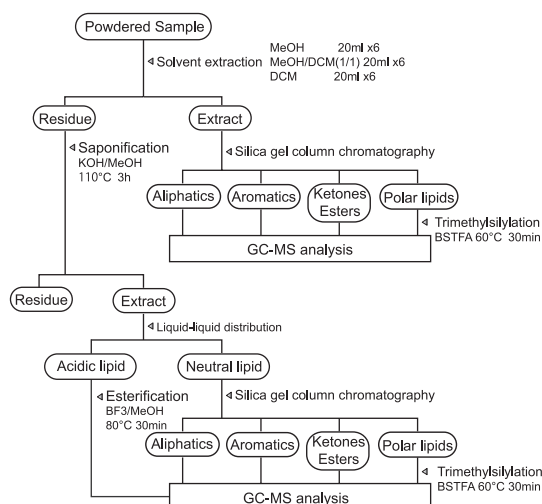
遊離態画分およびけん化後の中性画分はシリカゲルカラム (内径 6 mm, 長さ 8 cm) によって 4

Table. 1 Data of aliphatic hydrocarbons from the Cretaceous Shuparogawa Formation in the Tengunosawa River route, Oyubari area, central Hokkaido.

Sample No.	Location number	Sample type*	Separation method	Dry weight (g)	CPI	Pr/Ph	L/H	22 S/(22 S + 22 R) of C ₃₁ hopane	20 S/(20 S + 20 R) of C ₂₅ sterane
T15M	TNG15	mudstone	—	—	1.29	5.26	0.80	0.58	0.49
T15F1	TNG15	plant (stem) in sandstone	picking	0.13	1.39	5.13	0.44	0.53	0.43
T15F2	TNG15	plant (stem) in sandstone	picking	0.20	1.37	4.84	1.34	0.61	0.40
T17M	TNG17	mudstone	—	—	1.21	2.75	0.85	0.56	0.45
T17F1	TNG17	plant (stem) in sandstone	picking	0.36	1.49	6.05	36.89	0.60	0.45
T17F2	TNG17	plant (chip) in sandstone	picking	0.07	1.52	3.95	21.69	0.55	0.44
T17DC	TNG17	plant fragments in sandstone	Density centrifugation	0.24	1.43	5.04	1.12	0.58	0.49

Carbon Preferential Index (*n*-alkane) : $CPI = 1/2 \{ (C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31}) / (C_{24} + C_{26} + C_{28} + C_{30}) + (C_{25} + C_{27} + C_{29} + C_{31}) / (C_{26} + C_{28} + C_{30} + C_{32}) \}$, L/H (*n*-alkane): $L/H = C_{14} - C_{24} / C_{25} - C_{33}$

*description in parentheses are appearance of each manually picked plant fossils ; (stem: elongate shaped, chip: boxy or rounded)

**Fig. 3** A flowchart of analytical procedure

つに分画した。それらは脂肪族炭化水素画分（ヘキサン，4 ml），芳香族炭化水素画分（ヘキサン/トルエン，3/1, v/v, 4 ml），ケトン・エステル画分（ヘキサン/酢酸エチル，9/1, v/v, 4 ml），極性脂質画分（酢酸エチル/MeOH, 1/1, v/v, 4 ml）である。

溶媒抽出成分およびけん化抽出成分の極性脂質画分はそれぞれ BSTFA (N,O-Bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetoamide) でトリメチルシリル (TMS) 化を行った (60°C, 30 分)。また，けん化抽出成分の酸画分は 14% 三弗化ほう素 (BF₃)/MeOH を用いて 80°C, 30 分間加熱し，メチルエステル化を行った。

2.4 ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS)

ガスクロマトグラフ質量分析計は，Hewlett-Packard 社製 6890 シリーズ GC-MSD 5973 (スプ

リットレス導入部，キャピラリーカラム HP-5 HT；内径 0.25 mm，長さ 30 m，膜厚 0.1μm) を用いた。オープン温度は 50°C で 4 分間保持した後，300°C まで 4°C/分で昇温した。300°C に達した後は 20 分間保持した。キャリアガスは高純度ヘリウムを用いた。質量分析計によるイオン化は電子衝撃法 (EI) であり，イオン化電圧は 70 eV で行った。イオン検出は m/z 50～550 で行った。化合物の同定は NIST ライブラリー 1998 を使用した。

2.5 連続抽出実験

抽出残渣物の封管加熱実験において，リフラックス抽出とけん化で得られる成分について各々区別するために，比重分離して得られた木片化石 (T 17 DC) を用いて以下の一連の連続抽出実験を行った。その意義などについては後述する。

1) 溶媒抽出，2) 高温での MeOH によるリフラックス抽出；抽出残渣物を 20 ml アンプル管に入れ MeOH 10 ml を加えて（ただし，KOH は加えない）封管し，けん化の条件と同様の 110°C で 3 時間，リフラックス抽出した。3) けん化抽出；MeOH のリフラックス抽出後の残渣物に対して，さらに，1 N KOH/MeOH によるけん化を行った。溶媒抽出および二段階の封管抽出により得られた抽出成分は，他の試料と同様に分離誘導体化を行い，GC-MS で分析した。

3. 結果と考察

3.1 連続抽出実験

本研究のように植物化石の抵抗性高分子の情報を得たい場合には，その中の‘結合態’成分のみ

を遊離態成分と明確に区別して分析する必要がある。したがって、常温での抽出処理において遊離態成分が完全に抽出されているのか、また、高温下でのけん化処理において、エステル結合が切断されて高分子から解放された結合態分子のみが見出されているのか、常温下で抽出しきれない、非共有結合のような弱い結合で存在する分子が高温条件下で抽出されるのか、について確認したい。そのために、砂岩試料 (TNG 17) から比重分離で得た木片試料を使って、1) 常温での溶媒抽出、2) 高温 (110℃) での KOH なし MeOH だけでのリフラックス抽出、3) KOH/MeOH によるけん化を連続的に行い、各々で得られる化合物を検討した。それらの処理によって、*n*-アルカン、脂肪酸メチルエステル (FAME)、脂肪酸、脂肪族アルコールがおもに見出された (Fig. 4)。化合物ごとの各処理の段階における回収率 (全処理の回収量あたりの割合) と、各々の炭素数分布を Fig. 5 に示した。

n-アルカンや脂肪酸メチルエステルといった低極性化合物は、最初の溶媒抽出の段階でほとんどすべて (全処理の回収量あたりの 95% 以上) が抽出された。次のリフラックス抽出では *n*-アルカンと脂肪酸メチルエステルはほとんど回収されず (それぞれ 0.2%, 2.3%), けん化処理後でも *n*-アルカンがごく微量 (0.3%) しか検出されなかった。このことから、常温での溶媒抽出によって遊離態成分がほぼ完全に化石試料から分離されていることがわかった。溶媒抽出された *n*-アルカンは高等植物ワックス由来と考えられる C_{27} と C_{29} に極大をもつ。それに対して、高温でのリフラックス抽出やけん化でごくわずかに得られる *n*-アルカンの炭素数分布は C_{17} に極大をもち、はじめに抽出されたものの分布と顕著に異なっていた。これは、溶媒抽出 (遊離態) 成分と、それ以降の段階で抽出される成分の植物片中での状態存在が大きく違うことを示唆していると考えられる。

脂肪酸は $C_{10} \sim C_{26}$ 飽和脂肪酸 (アルカノイック酸) が同定され、 C_{16} 、 C_{18} 脂肪酸の割合が顕著に大きい。脂肪酸の連続抽出実験の結果は *n*-アルカンなどと対照的な傾向を示し、溶媒抽出ではほとんど検出されず、けん化により大部分 (72.5%) が回収された (Fig. 5a)。ただし、リフラックス抽出でも多量に回収されている (27.5%)。この結果か

ら、本研究の木片化石から得られた脂肪酸のほとんどは、化石中の高分子有機物にエステル結合している結合態脂肪酸であるといえる。一方、常温で抽出される遊離態脂肪酸はほとんど存在していないことがわかった。リフラックス抽出とけん化で得られる脂肪酸の炭素数分布のパターンはほとんど同じで (Fig. 5b), おそらく由来する成分が同じか、各々関連性が高いものどうしであると推察される。

脂肪族アルコールは *n*- $C_{10} \sim n$ - C_{26} アルカノールが検出された。*n*-アルカノールは溶媒抽出で 27.0%, リフラックス抽出で 37.4%, けん化で 35.5% と、全処理段階でほぼ同量、回収された (Fig. 5a)。これは *n*-アルカノールが木片化石中で遊離態成分や、高分子へエステル結合している一部分など、さまざまな状態で存在していることを意味するものと考えられる。また、各処理で回収される *n*-アルカノールの炭素数分布は大きく異なる (Fig. 5b)。溶媒抽出処理では *n*- C_{12} アルカノールの割合が最大であり、短鎖アルカノールだけが目立つ。長鎖 ($>C_{30}$) アルカノールは微量にしか検出されない。リフラックス抽出では C_{14} 、 C_{16} 、 C_{18} アルカノールの割合が増加し、けん化ではそれらがもっとも多く占めるようになる。また、長鎖成分の割合も増加する。さらに、けん化で得られる *n*-アルカノールでは偶数炭素優位性が明確にみられる。おそらく、より長鎖で偶数炭素数の *n*-アルカノールが、エステル結合態部位として高分子有機物を構成していると考えられる。

高温条件下でのリフラックス抽出で回収される成分について、*n*-アルカンなど低極性化合物は無視できるほど少ないものであったが、脂肪酸と *n*-アルカノールは溶媒抽出処理で得られた成分より多量に存在した。これらの成分についてはどのように考えるべきか。遊離態の脂肪酸や *n*-アルカノールが何らかの形で化石中の高分子有機物に強固に付着していたか、あるいは、非共有結合的に高分子有機物に結合していた可能性がある。それらが、より強い条件の高温によるリフラックス抽出によって、高分子有機物から放出されたと考えられる。さらに具体的には、低分子量化合物が高分子に分子間力や物理的な閉塞により非共有結合的に取り込まれる状態のことを吸蔵 (occlusion)

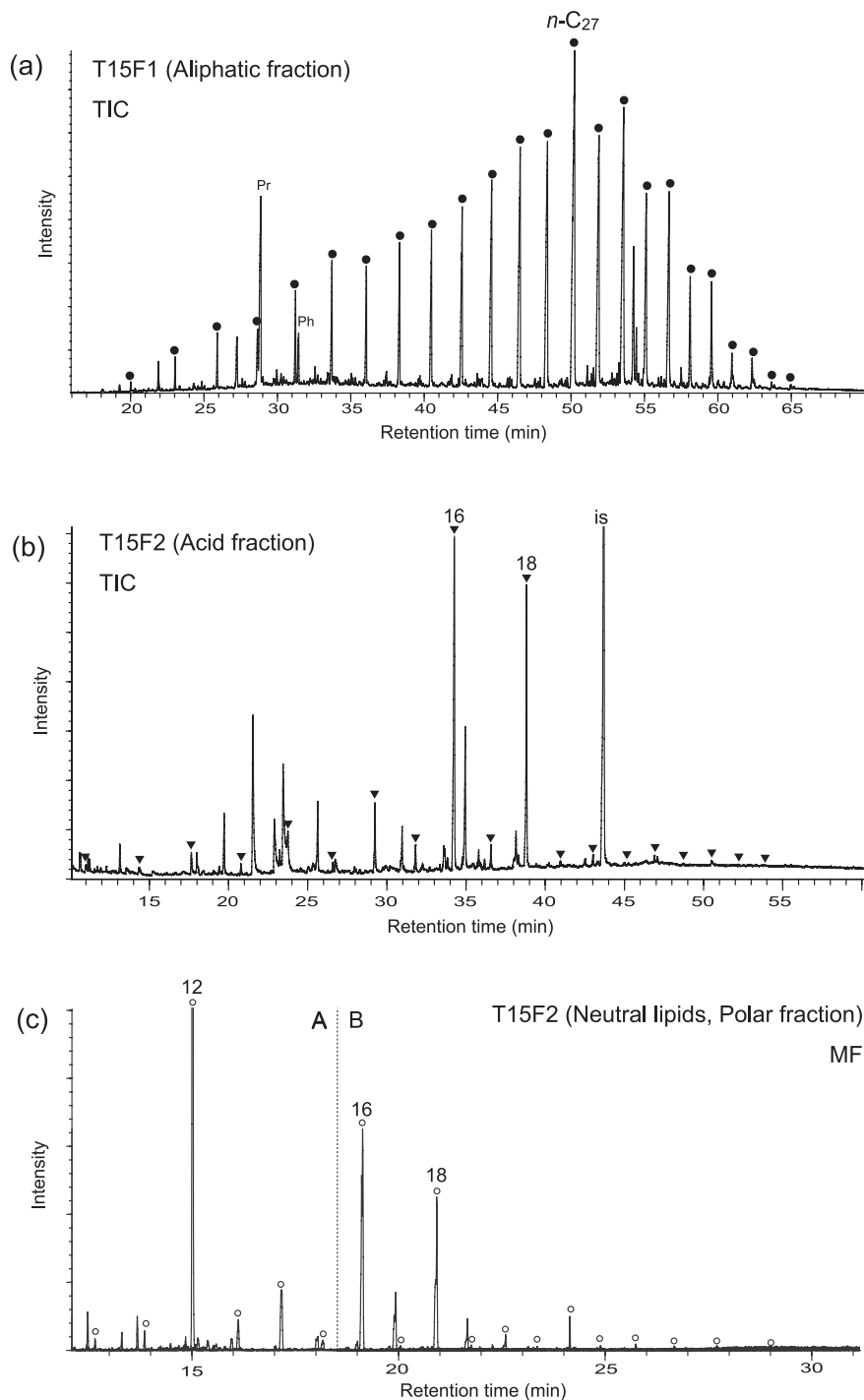
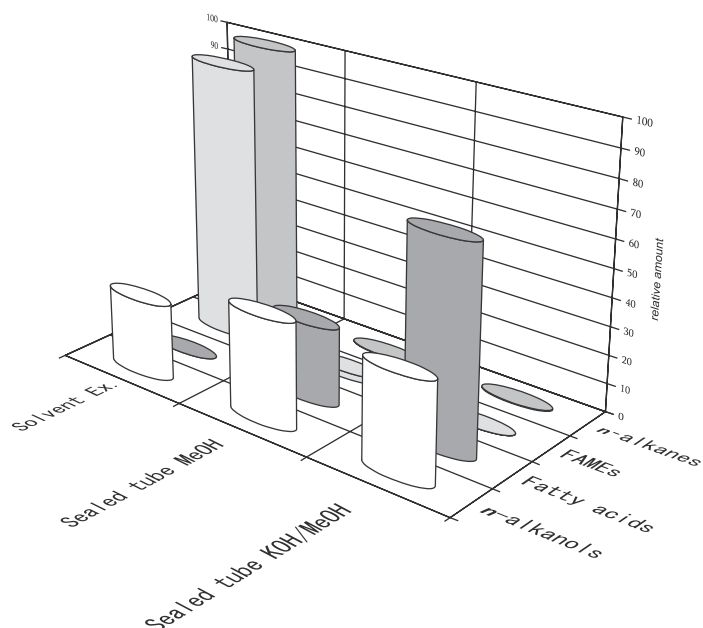


Fig. 4. (a) Partial total ion chromatogram (TIC) of aliphatic fraction of T 15 F 1, (b) partial TIC of acidic lipid fraction of T 15 F 2 (after saponification), and (c) superposed mass chromatograms of polar lipids fraction of T 15 F 1 (after saponification); A: m/z 215, 229, 243, 257, 271, 285 (12~18.5 min) and B: m/z 299, 313, 327, 341, 355, 369, 397, 411, 453, 467 (18.5~). (Pr: Pristane, Ph: Phytane, ●: n -alkanes, ▼: fatty acids, ○: n -alkanols), is: internal standard

(a)



(b)

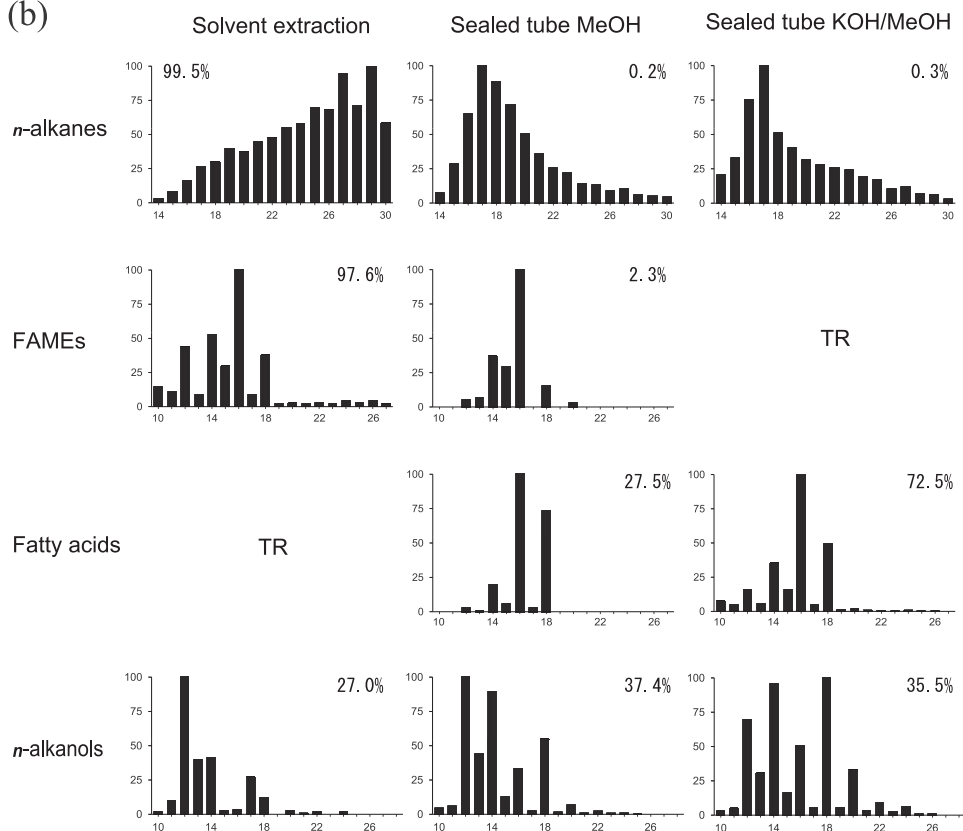


Fig. 5. (a) Relative abundances and (b) distributions of *n*-alkanes, FAMES, fatty acids and *n*-alkanols obtained by progressive treatments of woody fossil fragments. TR: trace

というが、そのようなことが化石有機物、とくに化石中の抵抗性高分子中で起こり得ると考えられている (Almendros et al., 1999)。植物化石における吸蔵の要因や機構はほとんどわかっていないが、おそらく堆積後の続成段階で抵抗性高分子中に吸蔵の起こる場 (空間) が形成されて、そこに遊離態分子が非共有結合的に閉塞されると推察される。今後の研究が必要だが、本研究の連続抽出実験の結果から、そのような吸蔵された分子が化石中で保存される有意な成分になり得ることを提示する。

3.2 遊離態成分

砂岩から分離した木片化石 (ピッキング: T 15 F 1, T 15 F 2, T 17 F 1, T 17 F 2; 比重分離: T 17 DC, T 20 DC) において、溶媒抽出性の遊離態成分は、*n*-アルカン、分枝鎖炭化水素、ステラン、ホパン、芳香族炭化水素がおもに同定された。それらの各種指標の分析結果を Table. 1 に示した。*n*-アルカンの炭素数分布は C_{12} から C_{37} であり、長鎖 ($>C_{30}$) でやや奇数炭素優位性が見られる。このような成分は陸上高等植物のクチクラのワックス由来とされる。ただし、Carbon Preferential Index (CPI) を計算すると、全試料を通して 1.5 以下であり、奇数優位性は失われているといえる。L/H 比は低分子量 *n*-アルカンと高分子量 *n*-アルカンの寄与の割合を示す値で、T 17 F 1 と T 17 F 2 が極端に大きな値を示した。プリスタン/フィタン比 (Pr/Ph) は 3.95~6.05 で、全試料でプリスタンが卓越していた。この Pr/Ph 値の範囲は Sawada (2006) によると酸化的で陸源有機物の寄与が大きい堆積環境を示している。一方、本研究で試料を採取した地層はタービダイト性の砂岩に富む砂岩泥岩互層であり (Takashima et al., 2004), Pr/Ph 値はそれと調和的である。熟成度指標としてホパンとステランの異性体比を用いた。 C_{31} ホパンの $C-22$ 位炭素の異性体比 ($S/(S+R)$ 比) は 0.53-0.63 とほぼ終点に達しており、 C_{29} ステランの $C-20$ 位炭素の異性体比 ($S/(S+R)$ 比) は 0.40-0.49 の範囲内であった。これらの値は、本研究の試料の熟成が後期続成段階からカタジェネシス段階に達していることを示すものである (Killops and Killops, 2005)。

さらに、近接する層準の泥岩試料 (T 15 M, T 17 M) についても、上記の各種指標を同様に分析した (Table 1)。それらの結果は、木片化石試料と類似していた。つまり、木片化石中の遊離態成分はまわりの岩石中のそれらとほとんど同様のものか、関連性の高いものであることが示唆された。

3.3 エステル結合態分子の組成分布

木片化石のけん化処理により得られた成分のうち、酸画分からは脂肪酸、中性の極性画分からは *n*-アルカノールがそれぞれ検出された。前述したように、それらは木片化石を構成する高分子有機物にエステル結合していた分子であると考えられる。ピッキングと比重分離により分離された木片試料における脂肪酸と *n*-アルカノールの炭素数分布を、それぞれ Fig. 6a, 6b に示した。

3.3.1 脂肪酸

脂肪酸は短鎖 ($<C_{20}$) が卓越しており、とくに C_{16} に極大を持ち、次いで C_{18} が豊富であった。それらには強い偶数炭素優位性が見られる。化石有機物中の結合態脂肪酸、とくに C_{16} , C_{18} 脂肪酸については、植物表皮を構成する抵抗性高分子のクチン (cutin) に由来すると考えられている (de Leeuw and Largeau, 1993)。また、近年、生体膜脂質や貯蔵性脂質など主要な生体成分の脂肪酸が高分子の一部になる反応が続成段階でおこり、それらの化石高分子有機物中での貢献が大きいことが提唱されている (Gupta et al., 2007)。このような脂肪酸は単独では分解されやすい成分であるが、抵抗性高分子に取り込まれたり、その場で自身や他の遊離態分子と結びついて高分子化が起こること (Gupta et al., 2007) で難分解性成分に変わり保存されるという。そのような脂肪酸も炭素数が 16 と 18 のものが卓越する。本研究の木片化石において、生体の主要な脂肪酸の関与が大きく、タクサの違いが反映されていない可能性もある (Fig. 6)。

ピッキングした木片化石試料 (T 15 F 1, T 15 F 2, T 17 F 1, T 17 F 2) における脂肪酸の組成分布は、試料間で C_{16} と C_{18} の比などにやや違いが見られるもののほとんど同じであることがわかった。ピッキングした木片化石それぞれは、ある単

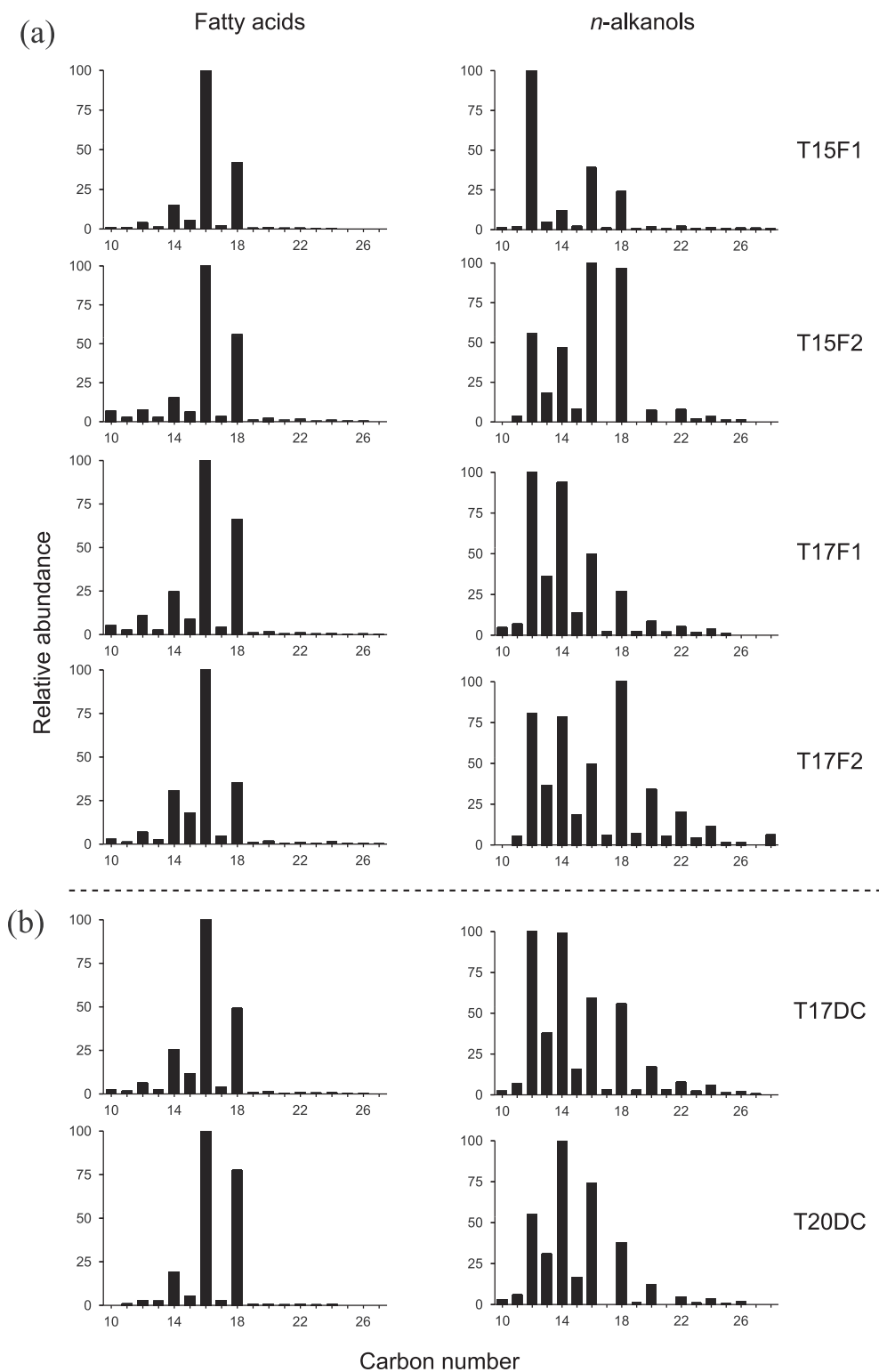


Fig. 6. Distribution of fatty acids and *n*-alkanols obtained by KOH/MeOH hydrolysis in the residues of woody fossil fragments by picking (a) and density centrifugation (b), after solvent extraction.

一植物種が破片化してできた化石片であるといえる。そして、同一の堆積層に含まれる各々の木片化石は、多種多様の植物に由来している可能性が高い。そのようなピックアップした木片化石において脂肪酸分布が同様であることは、種類が違う試料においてもほとんど多様性のないことを示しているといえる。一方、比重分離した試料 (T 17 DC, T 20 DC) は岩石に含まれる木片化石をほとんどすべて回収したものであり、そのような試料における化学分析データは、堆積層 (岩) 中のバルクの木片化石の平均値を示しているといえる。この比重分離試料の脂肪酸分布パターンは、ピックアップ試料とほとんど同じである (Fig. 6b)。この木片化石における脂肪酸分布パターンの均質性は、植物が堆積後に強い続成作用を受けて変化した結果であると推察している。もとの植物生体が堆積した後に、強い続成・熟成作用によってクチンの難分解性部位 (ユニット) のみが選択的に保存され、もとの植物生体クチンあるいはそれ以外の抵抗性高分子を構成する多様な脂肪酸ユニットが失われてしまった可能性がある。その結果、選択保存されたクチンの一部分の組成が強く反映された脂肪酸分布パターンに、すべての化石試料が変化したということである。または、本研究の木片化石中の結合態脂肪酸が、生体膜脂質や貯蔵性脂質を構成する主要な生体脂肪酸に由来していると考ええると、そのような脂肪酸は植物種において多様性がなく同様の組成分布をもつので、化石に見られる組成の均質性を説明できるのかもしれない。いずれにしても、本研究における木片化石の結合態脂肪酸の組成分布パターン解析の結果は、もとの植物の化学分類や続成作用の指標としてあまり応用できないことを示していると結論できる。

3.3.2 *n*-アルカノール

木片化石のけん化処理により得られた *n*-アルカノールは短鎖 (<C₂₀) のものが卓越し、強い偶数炭素優位性を示した。また、長鎖 (C₂₈) まで連続的に分布している試料もあった (試料 T 17 F 2)。この結合態 *n*-アルカノールについては、短鎖 (<C₂₀) と長鎖 (>C₂₀) 化合物で起源が異なると考えられる。C₂₀ 以上の長鎖 *n*-アルカノールはコ

ルク質を構成する抵抗性高分子であるスベリン (suberin) に由来することが知られている (de Leeuw and Largeau, 1993)。本研究では、長鎖 *n*-アルカノールは遊離態成分から検出されないもので、明らかにスベリンのような高分子の結合態成分であることがいえる。一方、短鎖 *n*-アルカノールについては具体的な起源については現時点では不明であるが、堆積後の微生物分解などの初期続成過程における続成生成物であると推定している。とくに C₁₄ 以下の *n*-アルカノールについては遊離態成分から主要な化合物として見出されるので、これらは植物生体の抵抗性高分子に直接関係しない可能性もある。

n-アルカノールの組成分布パターンは、脂肪酸と対照的に、ピックアップした木片化石試料間で大きく異なることがわかった。また、比重分離した試料とも有意に異なった。このピックアップした木片化石における *n*-アルカノールの組成分布の多様性の要因として、以下のことが考えられる。

- 1) 植物分類学的な要因：結合態の長鎖 *n*-アルカノール分布において、C₂₆、C₂₈ の相対比に違いが見られた。これは起源と考えられる植物生体のスベリンを構成するアルキル炭素骨格の違いによるものと推察している。このスベリン中の *n*-アルカノールユニットの炭素数は植物の種類によって多様性があることが報告されている (Holloway, 1983)。現時点では、植物種と結合態 *n*-アルカノールの分布パターンとの関係を示すデータはほとんど得られていないので具体的な植物種の判定まではできないが、例えば、*n*-C₂₈ アルカノールが目立って多く含まれる木片化石試料 T 17 F 2 は、他の試料とは異なる分類群の植物に由来することが指摘できるかもしれない。
- 2) 初期続成作用の要因：短鎖 *n*-アルカノール分布や、長鎖/短鎖 *n*-アルカノール比は、試料による続成作用の種類や段階の違いによるものと推察される。試料 T 15 F 1 は C₁₂ の割合が目立って大きく、かつ長鎖 *n*-アルカノールの割合は他と比べて低い。これは続成作用のうち、とくに初期続成段階での微生物分解が強く働いたと考えられる。一方、試料 T 17 F 2 は C₁₈ がもっとも高く、長鎖成分の割合も高いことか

ら、続成作用の影響が比較的少なく、保存状態がよかった可能性を指摘できる。

- 3) 環境要因：もとの植物体の生育時の環境条件によって、生体成分の組成に違いが表れる。それが、木片化石のエステル結合態 *n*-アルカノール分布に反映されている可能性もある。植物生体において、スベリンは水の不透水性を与えて細胞を保湿する機能をもつ。しかし、生育場が湛水したり多湿になると誘導されないなど環境条件によって合成が制御されることが報告されている(島村・望月, 2005)。これは、同一種であってももとの植物中のスベリン、あるいはそれに由来する *n*-アルカノールの相対量に多様性があることを意味する。例えば、それが本研究の木片化石において長鎖/短鎖 *n*-アルカノール比を決める大きな要因になっているかもしれない。

上述した 1), 2), 3) の要因を利用すれば、*n*-アルカノール分布の特徴は化学分類、続成作用、タフオノミー、古環境を解析・復元する指標になり得る可能性がある。このような木片化石から得られる結合態 *n*-アルカノールは、植物の分子古生物学における有力な指標・プロキシールになり得ることを提案する。植物化石片の有機地球化学的研究は現時点では少ないが、このような研究から情報を蓄積して発展させると、古植物学や植生史、陸上環境の変動史についての研究のブレースルーとなると期待される。

4. まとめ

北海道大夕張地域の下部白亜系に含まれる木片化石をピッキングと比重分離により採取し、それらを有機溶媒抽出した後にアルカリ加水分解(けん化)し、回収された化合物の組成分布を系統的に調べた。また、有機溶媒抽出、高温でのリフラックス抽出、けん化を連続的に行う実験を行い、化石中の遊離態、結合態分子の存在形態の検討を行った。その結果は以下のとおりである。

1. 木片化石の連続抽出実験の結果、*n*-アルカンや脂肪酸エステルといった低極性化合物は溶媒抽出成分(遊離態成分)として回収された。脂肪酸と長鎖($>C_{20}$) *n*-アルカノールはほとんどがけん化処理後に回収され、おもにエステル結合

態分子として化石中の高分子に存在していることが示された。ただし、高温リフラックス抽出処理でも脂肪酸と短鎖 *n*-アルカノールは多量に回収され、これらは非共有結合的な弱い結合で高分子に取り込まれた分子部位に由来することを推察した。

2. けん化処理後に得られる脂肪酸の組成分布パターンは、すべての木片試料をとおして同様であった。これは強い続成変化を受けたことによる木片化石中の脂肪酸分布の均質化を示していると推定した。この結果から、エステル結合態脂肪酸の組成分布は、熟成が進んだ植物化石試料においては化学分類などの分子古生物学的指標としての応用は期待できないと結論づけた。
3. 木片化石のけん化処理後に得られる *n*-アルカノールの組成分布パターンは、試料ごとに多様であることがわかった。とくに長鎖 *n*-アルカノールは抵抗性高分子であるスベリンを構成する分子ユニットから派生したと考えられ、それらの組成分布は有力な化学分類指標になり得ると推察した。一方、短鎖 *n*-アルカノールの組成分布は続成作用・タフオノミーに関わって変化することを提案した。さらに、乾燥・湿潤などの環境条件とスベリン誘導の関係を利用して、*n*-アルカノール分布が環境プロキシールにもなり得る可能性を指摘した。

謝 辞

北海道大夕張地域の白亜系調査・堆積岩採取において、北海道大学理学院(現：東海大学海洋学部)の高嶋礼詩博士にお世話になった。北海道大学理学院の鈴木徳行教授には本研究において有益な意見を頂いた。2名の匿名の査読者には本論文の査読を通して貴重なご助言を頂いた。記して感謝いたします。本研究を進めるにあたり、文部科学省科学研究費(課題番号：16740291, 18684028)を使用した。また、本研究の一部は文部科学省 21 世紀 COE プログラム(北大 新・自然史科学創世：自然界における多様性の起源と進化、プログラムリーダー 岡田尚武)の助成による。

引用文献

Abbott G. D., Ewbank G., Edwards D. and Wang G.-

- Y. (1998) Molecular characterization of some enigmatic Lower Devonian fossils. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **62**, 1407-1418.
- Almendros G., Dorado J., Sanz J., Alvarez-Ramis C., Fernandez-Marron M. T. and Archangelsky S. (1999) Compounds released by sequential chemolysis from cuticular remains of the Cretaceous Gymnosperm *Squamastrobis tigrensis* (Patagonia, the Argentine). *Org. Geochem.* **30**, 623-634.
- Arai T., Sawada K. and Tsukagoshi M. (2003) Search for chemotaxonomic markers in Neogene plant fossils from Tokai Group, Japan. *Geochim. Cosmochim. Acta* **67** (18 S), A 21.
- de Leeuw J. W. and Largeau C. (1993) A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal, and petroleum formation. In: Engel, M. H. & Macko, S. A. (Editors), *Organic Geochemistry* pp. 23-72, Plenum Press, New York.
- Gupta N. S., Briggs D. E. G., Collinson M. E., Evershed R. P., Michels R., Jack K. S. and Pancost R. D. (2007) Evidence for the in situ polymerisation of labile aliphatic organic compounds during the preservation of fossil leaves: Implications for organic matter preservation. *Org. Geochem.* **38**, 499-522.
- Hauteville Y., Michels R., Malartre F. and Trouiller A. (2006) Vascular plant biomarkers as proxies for palaeoflora and palaeoclimatic changes at the Dogger/Malm transition of the Paris Basin (France). *Org. Geochem.* **37**, 610-625.
- Holloway P. J. (1983) Some variations in the composition of suberin from the cork layers of higher plants. *Phytochemistry* **22**, 495-502.
- Killops S. and Killops V. (2005) Introduction to organic geochemistry pp. 224-225, Blackwell publishing, Australia.
- Lockheart M. J., van Bergen P. F. and Evershed R. P. (2000) Chemotaxonomic classification of fossil leaves from the Miocene Clarkia lake deposit, Idaho, USA based on n-alkyl lipid distributions and principal component analyses. *Org. Geochem.* **31**, 1223-1246.
- Otto A. and Simoneit B. R. T. (2001) Chemo-systematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** (20), 3505-3527.
- Pastorova I., Weeding T. and Boon J. J. (1998) 3-Phenylpropanylcinnamate, a copolymer unit in Sieburgite fossil resin: a proposed marker for the Hammamelidaceae. *Org. Geochem.* **29**, 1381-1393.
- Sawada K. (2006) Organic facies and geochemical aspects in Neogene neritic sediments of Takafu syncline area of central Japan: Paleoenvironmental and sedimentological reconstructions. *Island Arc*, **15**, 517-536.
- Sawada K., Handa N., Shiraiwa Y., Danbara, A. and Montani S. (1996) Long-chain alkenones and alkyl alkenoates in the coastal and pelagic sediments of the northwest North Pacific, with special reference to the reconstruction of *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica* ratios. *Org. Geochem.* **24**, 751-764.
- 島村 聡・望月俊宏 (2005) 二次通気組織の形成と植物の耐湿性. 根の研究 (*Root Research*) **14**, 149-155.
- Takashima R., Kawabe F., Nishi H., Moriya K., Wani R. and Ando H. (2004) Geology and stratigraphy of forearc basin sediments in Hokkaido, Japan: Cretaceous environmental events on the north-west Pacific margin. *Cretaceous Research* **25**, 365-390.
- Tu T. T. N., Derenne S., Largeau C., Mariotti A. and Bocherens H. (2003) Comparison of leaf lipids from a fossil ginkgoalean plant and its extant counterpart at two degradation stages: diagenetic and chemotaxonomic implications. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **124**, 63-78.