

微生物バイオマーカーの炭素・水素同位体組成*

金子 雅紀**・奈良岡 浩***

(2011年6月1日受付, 2011年8月12日受理)

Abstract

Prokaryotic activities contribute to geochemical cycles on an Earth environment. To investigate roles of the prokaryotes in the environments, carbon and hydrogen isotopic compositions of lipid biomarkers can be a useful tool. This review describes carbon and hydrogen isotope fractionation associated with variety of metabolic and lipid synthetic pathways, factors controlling the isotope fractionation, and their applications into natural environments. Isotopic compositions of prokaryotic biomarkers potentially provide much information such as source organisms and environmental factors when they were biosynthesized.

1. はじめに(地球史における微生物活動のインパクト)

地球史における有機化合物の時空間分布とその役割を明らかにすることは有機地球化学の大きな課題である。現在、地球上に存在する生物はリボソーム RNA による系統分類によれば、ユーカリア(真核生物)、バクテリア(真正細菌)、アーキア(古細菌)の3つのドメインに分類され、有機化合物のほとんどすべてはそれらの生物活動に由来する。しかしながら、それぞれのドメインからの有機物の寄与は未だにはっきりしていない。特に、太陽光が届かず酸素の存在しない環境での原核生物(バクテリアとアーキア)による有機物への寄与の大きさが見積もられ、さらに、より深層におけるアーキアの増加が明らかになりつつある。また、アーキアは従来、高温や高塩分、強い酸、ア

ルカリ性条件などの極端な環境下に主に生息すると考えられてきたが、現在では地球のどんな環境にもありふれた存在であることがわかってきた。地球上の炭素サイクルのみならず、元素サイクルを解明する上で、これら原核生物による有機物の合成・代謝を理解することは重要である。

また、地球史46億年のうち、生命誕生から長い間、原核生物の時代であった。嫌気的な環境下で生息していた原核生物もシアノバクテリアの光合成による酸素発生を経て、好気的にも生きられるようになった。地球上における生命の起原および地球環境の進化を研究する上でも原核生物の代謝過程に関連した有機物の同位体組成を解明することが必要である。

原核生物の多様性を特徴づけるものとして、1) 様々な生息環境、2) 種々の化学物質の利用、3)

*Carbon and hydrogen isotopic compositions of prokaryotic lipid biomarkers

**独立行政法人海洋研究開発機構, 海洋・極限環境生物圏領域 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15
Masanori Kaneko: Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15
Natsushima-cho, Yokosuka, 237-0061 Japan
e-mail: m_kaneko@jamstec.go.jp Tel: 046-867-9812; Fax: 046-867-9775

***九州大学大学院, 理学研究院地球惑星科学部門 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1
Hiroshi Naraoka: Department of Earth and Planetary Sciences, Graduate School of Science, Kyushu University,
Fukuoka, 812-8581 Japan
e-mail: naraoka@geo.kyushu-u.ac.jp Tel: 092-642-2660; Fax: 092-642-2684

種々の代謝系, 4) 種々の脂質バイオマーカー, をもっていることが挙げられる。これら生息環境や用いる化学物質は代謝系を通して, バイオマーカーを構成する元素の安定同位体組成に反映し, 地球史の様々な試料中に記録されることになる。本総説では我々が関わってきた研究例なども取り入れながら, 原核生物の脂質バイオマーカーの炭素・水素同位体比の視点から, これら多様性をどのように読み解くことができるのかについて論ずる。

2. 環境試料に見出される脂質バイオマーカーの同位体的特徴

天然に存在する脂質バイオマーカーの同位体組成は上に挙げたような様々な原核生物の多様性を反映している。Fig. 1に示すのは, 起源生物が明らかでない天然試料(微生物マットや海底熱水噴出孔)や培養実験によるデータをもとにした, 天然環境でみられ得る各起源生物の脂質バイオマーカーの炭素同位体比($\delta^{13}\text{C}$ 値)の分布を示したものである。全体として -130‰ から $+4\text{‰}$ と非常に幅広い範囲に分布し, 嫌氣的メタン酸化アーキアは低く, 水素酸化バクテリアやメタン生成アーキアは高い値をとり得るなど, 各原核生物によって特徴的な炭素同位体比の範囲を持つことが分かる。このような同位体的特徴は, 原核生物によって用いる炭素基質や炭素固定経路が異なることに起因す

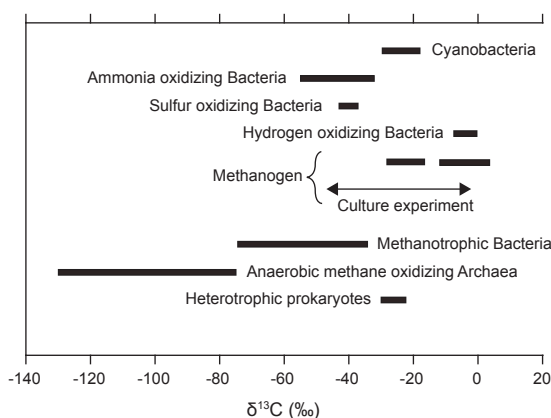


Fig. 1. Carbon isotope compositions of lipid biomarkers in natural environments. Literature data: see table 1.

る (Fig. 2)。しかしながら, 同一生物であっても数 10% 以上に分布し, そのために他の生物の同位体的特徴と重複するものも多い。これは, 同じ代謝系を持つ原核生物であっても, 炭素源自体の同位体比や代謝基質濃度, 温度などの環境因子が脂質バイオマーカーの炭素同位体組成に反映されるためである。つまり, この図は, 脂質バイオマーカーの炭素同位体組成を用いた起源生物の識別が, 必ずしも完璧な解像度を持たないことを強く意味している。このように, 脂質バイオマーカーの同位体比をツールとして扱う際には, バイオマーカーの同位体比の絶対値だけでなく, 炭素源(水素源)の同位体比や微生物を取り巻く環境因子, 種々の代謝経路も合わせて議論する必要がある。

3. 生息環境と利用化学物質

まず, 原核生物の様々な生息環境と利用しうる化学物質について記し, それらが生物の同位体組成に及ぼす効果について述べる。真核生物のほとんどが O_2 存在下に生息して好氣的代謝を行うのに対して, 原核生物は好氣的・嫌氣的な条件下で, エネルギーも光のほか, 無機および有機化学物質を用いる。例えば, 酸化剤(電子受容体)として, O_2 , NO_3^- , Mn^{4+} , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , S^0 , CO_2 などが, 還元剤(電子供与体)として, H_2 , CH_4 , H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, NH_4^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , 有機物などがある。酸化還元を組み合わせにより, 分子イオウ(S^0)などは酸化および還元反応の両方に用いられる。生み出されるエ

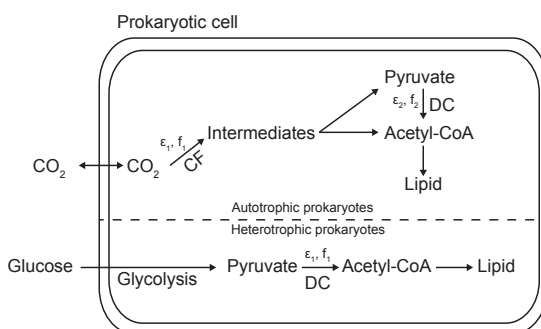


Fig. 2. Conceptual model of carbon isotope fractionation during carbon assimilation. CF: carbon fixation, DC: decarboxylation.

Table 1. Metabolic pathways of prokaryotes and carbon isotope signatures

	Carbon source	Hydrogen source	Central metabolism	Organism	Species	Carbon assimilation pathway	Biomarker	Isotope fractionation during lipid synthesis	$\delta^{13}\text{C}$ of biomarkers in natural sample
Aerobic	CO ₂	H ₂ O	Phototrophy	Cyanobacteria	General (ref. 1)	Calvin cycle	2-methylhopanoid (ref. 1)	22 to 30 (ref. 2)	-18 to -29.5 (ref. 3, 4)
	CO ₂	H ₂	Chemotrophy	Hydrogen oxidizing Bacteria	<i>Hydrogenobacter</i> , <i>Aquifex spp.</i>	Reverse TCA cycle	C _{20:1} fatty acid	1.2 (ref. 5)	-0.5 to -7.2 (ref. 6)
	CO ₂	H ₂ O	Chemotrophy	Sulfur oxidizing Bacteria		Calvin cycle	C _{16:1} fatty acid ?		-41.2 to -35.2 (ref. 6), -42.8 to -37.2 (ref. 7)
Autotroph	CO ₂		Chemotrophy	Ammonia oxidizing Bacteria	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Calvin cycle	Hopanoids	26-30 (ref. 8)	-26 to -55 (ref. 8)
Anaerobic	CO ₂	H ₂ S	Phototrophy	Phototrophic Bacteria	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Calvin cycle	Aromatic isoprenoids		
	CO ₂	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , S ⁰	Phototrophy	Green non-sulfur Bacteria	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	3-hydroxypropionate pathway		13-15, 17-18 (ref. 9)	
	CO ₂	H ₂	Chemotrophy	Methanogenic Archaea	General	Acetyl-CoA pathway	<i>sn-2-hydroxyarchaeol</i> , PMI	-8.2 to 47 (ref. 10)	-22.9 to -17.0 (ref. 11); -28 to -23.4 (ref. 11); -11.8 to +3.6 (ref. 12)
Heterotroph	Aerobic	CH ₄ , H ₂ O and CH ₄ (ref. 13)	Heterotrophy	Aerobic methane oxidizing Bacteria	<i>Methylococcus capsulatus</i>	RuMP	4-methylsteroids (ref. 14)	6-10 (ref. 15)	-15.7 to -9.8 relative to $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ (ref. 7)
					<i>Methylosinus trichosporium</i>	Serine		2	

1. Summons et al., 1999; 2. Sakata et al., 1997; 3. Zhang et al., 2007; 4. Buhring et al., 2009; 5. Jahnke et al., 2001; 6. Naraoka et al., 2010; 7. Naraoka et al., 2008; 8. Sakata et al., 2008; 9. van der Meer et al., 2001b; 10. Londry et al., 2008; 11. Schouten et al., 2001; 12. Bradley et al., 2009; 13. Sessions et al., 2002; 14. Jahnke and Nichols, 1986; Jahnke et al., 1999

エネルギーの大きさは Stumm and Morgan (1996) などに詳しい。これらの化学物質は多くの場合、エネルギーを取り出すために異化的に代謝され、体内に直接取り込まれなくても、その生息場に化学的・同位体的プールを形成するほか、栄養共生 (syntrophy) などによって、微生物バイオマーカーの同位体組成に反映される。

例えば、多くの独立栄養微生物の炭素源は溶存 CO₂ であり、水圏表層の溶存 CO₂ の濃度およびその炭素同位体比は pH やアルカリ度などによって支配される (例えば、奈良岡, 2006)。また、水深が増すにつれ、 $\delta^{13}\text{C}$ 値の低い有機物の分解のため、溶存 CO₂ 濃度は高く、その $\delta^{13}\text{C}$ 値は表層と比較して低くなる。炭素固定の同位体分別は溶存 CO₂ 濃度が高いほど大きいため、同位体的に軽いバイオマーカーが生成する (例えば、Freeman et al., 1994; Schoell et al., 1994)。逆に、深海の Lost City 熱水噴出孔において、岩石風化による CO₂ 消費と高温のため、溶存 CO₂ 濃度が極端に低くなり、同位体分別がほとんど起こらないことが報告されている (Bradley et al., 2009)。従属栄養生物の炭素同位体比は取り込む有機物の同位体比を反映する。同化的メタン酸化の場合には軽いメタンの同位体比を反映して、著しく低い $\delta^{13}\text{C}$ 値をもつバイオマーカーが報告されている。

有機物を構成する水素は独立栄養でも従属栄養で

においても Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) や Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) による水素化に由来するが、その水素源の多くは細胞水である。NAD(P)H と細胞水の水素同位体分別の大きさはわかっていないが、水素化された有機物と細胞水の水素同位体比の差は 70~80% 程度である。好氣的メタン酸化バクテリアでは、取り込んだメタンの段階的酸化により、細胞内にメタン由来の水素が蓄積し、バイオマーカーを構成する水素の約 30% がメタン起源であることが報告されている (Sessions et al., 2002)。また、好氣的な水素酸化では細胞膜内のヒドロゲナーゼにより、H₂ 由来の水素が NADH に取り込まれる。一般的に H₂ は同位体的に軽いため水素酸化バクテリアのバイオマーカーの水素同位体比は低い。また、嫌氣的条件下で、有機物は発酵により H₂ を発生し、堆積物中における酢酸やメタンの生成の水素源になっていると考えられる。

4. 代謝系と同位体分別

生体有機化合物の同位体組成は生物活動場における炭素源・水素源の同位体比の他に、生物自身の代謝過程により大きく変動する。とくに原核生物では様々な代謝メカニズムをもっているために、特徴的な同位体比の変動を示す。以下に 1) 炭

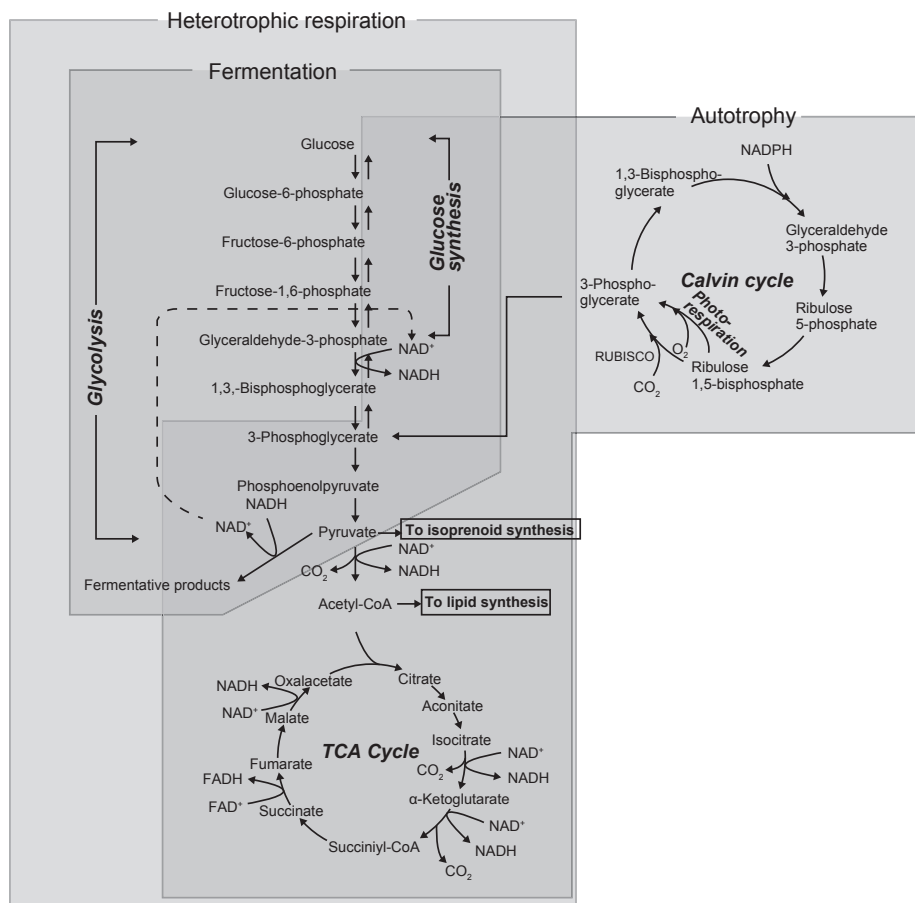


Fig. 3. Principle metabolic pathways in prokaryotes.

素固定, 2) 発酵・呼吸, 3) 脂質合成, の諸過程と同位体分別の特徴について述べる。

また, 脂肪酸の水素同位体組成が化学合成, 光合成, 従属栄養などによって変動し, 原核生物の代謝系を推定する手段として提案されている (Zhang et al., 2009)。

4.1. 炭素固定

4.1.1. カルビン回路 (Calvin cycle)

シアノバクテリア, アンモニア酸化バクテリア, イオウ酸化バクテリアなどの多くの光合成および化学合成細菌が用いている (Fig. 3)。

陸上 C3 植物や真核藻類と同じ炭素固定回路で, CO₂ 固定時の酵素は Ribulose-biphosphate carboxylase oxydase (RUBISCO) である。RUBISCO はカルボキシル化と酸素化の 2 つの反応を触媒し, その

機能のアフィニティの違いにより, 同じ酵素でも生物種によって異なる炭素同位体分別を示す。例えば, ホウレン草から単離した RUBISCO の炭素固定時の同位体分別は 29% であるのに対して, シアノバクテリアでは 20%, 光合成バクテリアでは 23% という報告がある (Guy et al., 1993)。アーキアにおいても好塩菌や超好熱菌などでカルビン回路の存在が確認されているが, その同位体分別は知られていない。

4.1.2. 逆 TCA 回路 (Reversed tricarboxylic acid cycle, Reversed TCA cycle)

逆クレブス回路または逆クエン酸回路とも呼ばれ, 好氣的に ATP を生産する TCA 回路を逆に回して CO₂ を固定化する (Fig. 4)。ちょうど TCA 回路では CO₂ が排出される場所で CO₂ が取り込

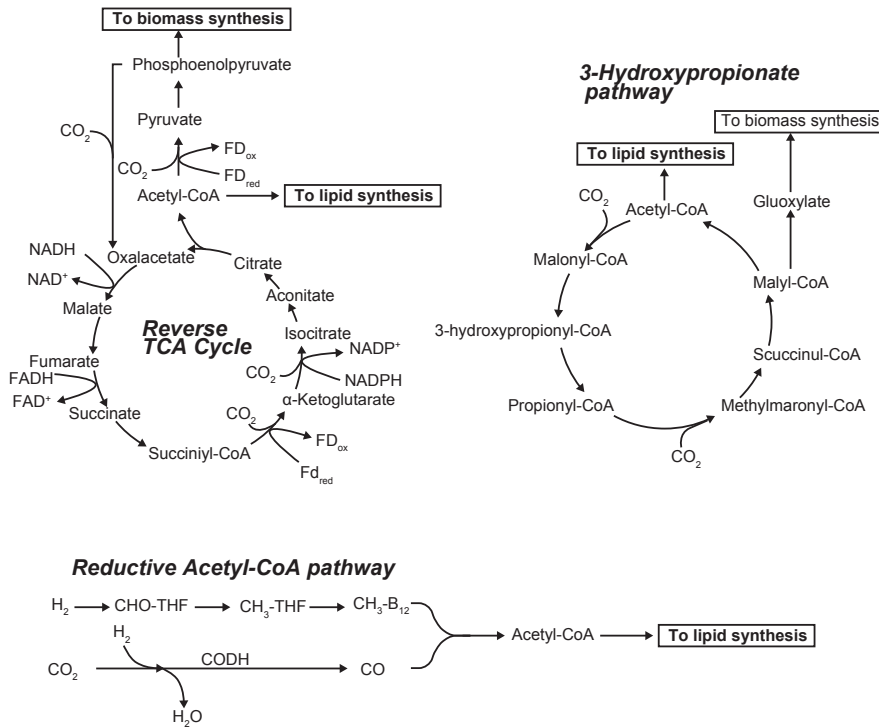


Fig. 4. Other metabolic pathways for carbon assimilation. FD, ferredoxin; THF, tetrahydrofolate; B₁₂, vitamin B₁₂.

まれている。逆 TCA 回路を用いているのはバクテリアでは緑色イオウ光合成バクテリア、水素酸化バクテリア、*Aquifex* などの一部が知られているが、アーキアでは超好熱菌 *Sulfolobus* の一部と限られている。逆 TCA 回路を用いる生物の同位体的特徴として、細胞全体の炭素同位体比がカルビン回路を用いるものより重く、さらに脂質成分の方が細胞物質より同位体的に重いことが挙げられる。これは逆 TCA 回路によって生成したアセチル-CoA に CO₂ が取り込まれる際に大きな同位体分別を伴って、相対的に軽いピルビン酸が生成するのに対して、アセチル-CoA からの脂質合成の際の同位体分別は大きくないためである (van der Meer et al., 1998; Jahnke et al., 2001)。

4.1.3. 3-ヒドロキシプロピオン酸経路 (3-Hydroxypropionate pathway)

炭素固定がアセチル-CoA に重炭酸イオンが導入されることで、最初に 3-ヒドロキシプロピオン酸が生じることからこの名称がある (Fig. 4)。緑

色非イオウ光合成バクテリアの一部がこの炭素固定系を用いている。炭素固定時の同位体分別の大きさはよくわかっていないが、細胞全体、脂肪酸、イソプレノイドの炭素同位体比が炭素基質 (DIC) に対してそれぞれ 13‰, 13-15‰, 17-18‰ ほど低くなることが培養実験により報告されている (van der Meer et al., 2001a, 2001b)。

4.1.4. 還元的アセチル-CoA 経路 (Reductive acetyl-CoA pathway)

他の 3 つの炭素固定系が回路となっているのに対して、CO₂ を H₂ で還元し、CO を経て、アセチル-CoA を生成する経路であり、回路ではない (Fig. 4)。硫酸還元菌や酢酸生成菌のようなバクテリアによって用いられ、最終生成物は酢酸である (Acetogenesis)。CO₂ の CO への還元には Fe, Ni を含んだ酵素 (Carbon monoxide dehydrogenase, CODH) が用いられる。アーキアによるメタン生成 (Methanogenesis) に用いられる経路・酵素群は同じではないが、CO₂ を H₂ で還元してメチル基を

生成する機能は同じなので、広義ではメタン生成の経路もアセチル-CoA 経路と呼ばれている。

CODHによる炭素固定時の同位体分別は明らかにはなっていないが、経路全体では、硫酸還元バクテリアにおいて最大で28% (*Desulfotomaculum acetoxidans*, Londry and Des Marais, 2003)、酢酸生成バクテリアでは最大で59% (*Acetobacterium woodii*, Gelwicks et al., 1989)と報告されている。メタン生成アーキアにおいても炭素固定時の同位体分別は不明であるがCO₂の $\delta^{13}\text{C}$ 値に対して、最終的に生成されるメタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は最大で80%まで低くなる。メタン生成は多段階の酵素反応によって進行していくが、methyl-tetrahydroarninapterin (methyl-H₄SPT)を分岐点として、メタン生成とアセチル-CoA生成(脂質・バイオマス生成)に炭素の流れが分かれる。このアセチル-CoA生成の時にCODHが使われ、生成される脂質の $\delta^{13}\text{C}$ 値はCO₂に対して最大で47%ほど低くなる(Londry et al., 2008)。

4.2. 発酵・呼吸

4.2.1. 解糖系 (Glycolysis)

解糖系はグルコースをピルビン酸に発酵分解し、エネルギー(ATP)を生み出す糖代謝系で、ほとんど全ての生物が用いている(Fig. 3)。好気性生物ではピルビン酸はさらなる酸化的代謝系に用いられ、嫌氣的生物では低分子カルボン酸やアルコールなどの代謝産物に分解される。最も一般的な解糖系はエムデン-メイヤーホフ経路(EM経路)で、グルコースは2分子のATPとピルビン酸を生み出す。一方、一部のバクテリア、アーキアはエントナー-ドウドロフ経路(ED経路)を用いているが、1分子のグルコースから1分子のATPしか得られない。アーキアの中には変形EM経路や非リン酸化ED経路を用いる者が報告されている(Madigan et al., 2009)。一般にEM経路(グルコース-ピルビン酸)での炭素同位体分別はほとんどないとされている(DeNiro and Epstein, 1977; Melzer and Schmidt, 1987)。

4.2.2. TCA回路 (Tricarboxylic Acid Cycle, TCA cycle)

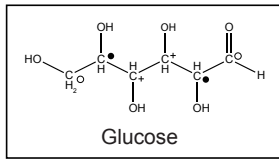
クエン酸回路、クレブス回路とも呼ばれ、酸素呼吸を行う生物に使われるエネルギー代謝系であ

る。解糖系によって生成されたピルビン酸の脱炭酸(酸化反応)によってアセチル-CoAが生成される。アセチル-CoAとオキサロ酢酸のアルドール縮合によって生じたクエン酸を出発物質として、一連の脱水、脱炭酸、酸化反応が進み、再びオキサロ酢酸が生成されることで回路が回っている(Fig. 4)。TCA回路全体では2分子のCO₂分子、3分子のNADH、1分子のFlavin adenine dinucleotide (FADH)が生じる。1分子のピルビン酸からは計15個のATPが生成され、解糖系から含めると1分子のグルコースから38個のATPが酸素呼吸で作られることになる。また、TCA回路はエネルギー代謝とともに、生合成にも重要である。例えば、 α -ケトグルタル酸やオキサロ酢酸は種々のアミノ酸生成に利用され、スクシニル-CoAはヘムなどのテトラピロール化合物生成に必要である。また、後に述べるように、アセチル-CoAは脂質合成の出発物質である。ピルビン酸からアセチル-CoAへの脱炭酸時には大きな同位体分別が起こり、これが生体を構成する脂質の $\delta^{13}\text{C}$ 値を炭素基質であるグルコースや、他の有機成分よりも低い値にしている一つの要因である(DeNiro and Epstein, 1977; Melzer and Schmidt, 1987)。

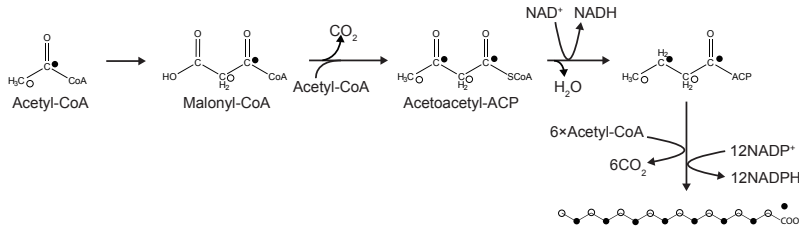
4.3. 脂質合成系

4.3.1. 酢酸-マロン酸経路 (Fatty acid synthesis)

バクテリアのもつ脂肪酸は真核生物と同様の酢酸-マロン酸経路によって生合成される。この経路において、脂肪酸はアセチル-CoAにマロニル-CoAが脱炭酸、脱水、還元されながら付加していくことによって、炭素鎖が2つずつ伸長していき、パルチミン酸(C₁₆)までが合成される。一般に、生体中や、最近の堆積物中に見いだされる直鎖脂肪酸や還元生成物である脂肪族アルコールの炭素数において偶数優位性がみられるのはこのためである。C₁₆以上の炭素鎖をもつ脂肪酸も合成され得るが、用いられる酵素が異なる。また、マロニル-CoAはアセチル-CoAの脱炭酸によって生成されるため、脂肪酸の炭素は、アセチル-CoAのメチル基とカルボニル基由来のものが交互に配列することになる(Fig. 5)。炭素数と炭素同位体比をクロスプロットした時に値がジグザグパターンを示すのは、奇数の脂肪酸合成時の出発物質にアセ



Fatty acid synthesis



Isoprenoid synthesis

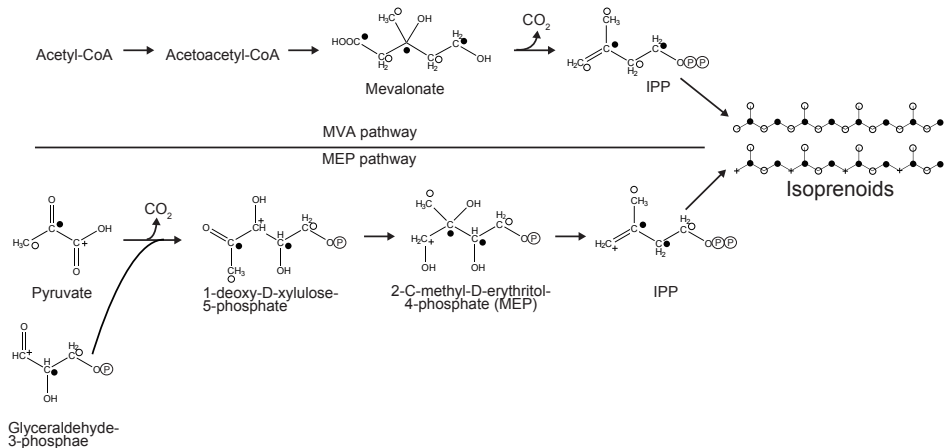


Fig. 5. Lipid biosynthetic pathway.

チル-CoA ではなくプロピオニル-CoA を用いること、付加するマロニル-CoA の2位とカルボニル基の同位体組成が違ふ事に起因する (Chikaraishi and Naraoka, 2007)。脂質の炭素同位体比が炭素源や炭素固定経路を反映して変化するのに対して、水素同位体比は水素源 (H₂O, 有機物基質, NADPH) やエネルギー代謝経路を反映して変化することが、培養実験から報告されている。例えば、合成された脂肪酸と培養に用いた水の間同位体分別係数 ($\epsilon_{FA-water}$) は従属栄養では +200‰ から -150‰, 光合成独立栄養では -200‰ から -150‰, 化学合成独立栄養では -400‰ から -200‰ となっている。特に脂肪酸を構成している水素 (C-H) の

50% は NADPH 由来であり、その同位体比はそれぞれの代謝系で用いられる種々の NADPH 生成 (脱水素化や H₂O 分解) 時の同位体分別に依存するとされている (Zhang et al., 2009)。

鳴子温泉では、系統解析の結果から、水素酸化バクテリアと硫酸酸化バクテリアが主な微生物組成である微生物マットを形成しているが、マット中の脂肪酸の炭素・水素同位体比の2次元プロットは明瞭に2つのグループに分かれる。1.) $\delta^{13}C = -7.2\text{‰}$ to -0.5‰ , $\delta D = -469\text{‰}$ to -356‰ , 2.) $\delta^{13}C = -41.2\text{‰}$ to -35.2‰ , $\delta D = -262\text{‰}$ to -173‰ (Fig. 6)。これは水素酸化バクテリアと硫酸酸化バクテリアの炭素固定経路 (逆 TCA 回路 vs. Calvin cycle),

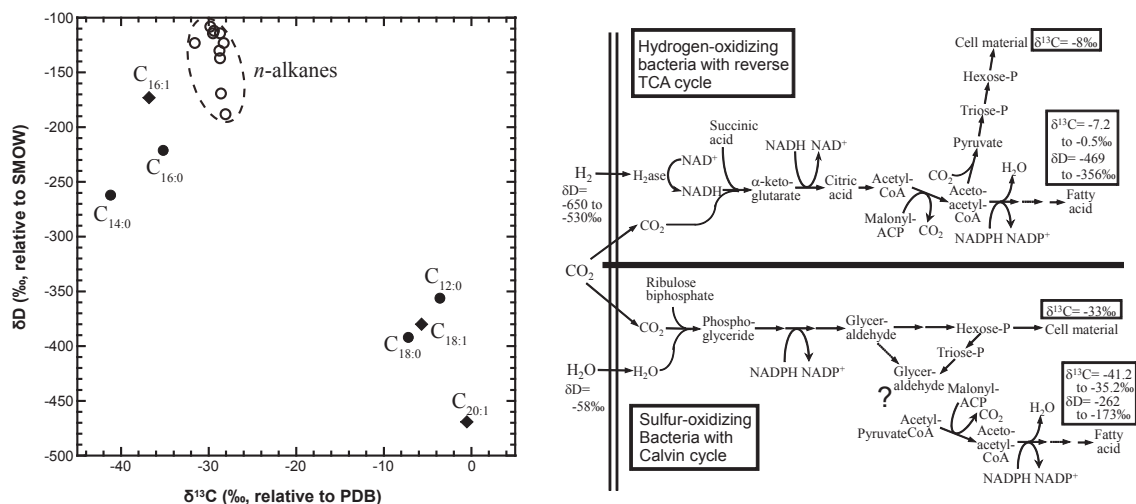


Fig. 6. $\delta^{13}\text{C}$ - δD distribution of fatty acids from a microbial mat in the Naruko hot spring (left), and carbon and hydrogen flow in fatty acid biosynthesis between hydrogen-oxidizing bacteria (reversed TCA cycle) and sulfur-oxidizing bacteria (Calvin cycle) (right, Naraoka et al., 2010).

化学合成独立栄養生物の水素源 (H_2 vs. H_2O) が脂肪酸の同位体組成によく反映された例である (Naraoka et al., 2010)。

4.3.2. メバロン酸経路 (Mevalonic acid pathway, MVA pathway)

原核生物はイソプレノイド合成経路としてメバロン酸経路か非メバロン酸経路のどちらかを利用している。そのうちメバロン酸経路は、多くの生物が用いている生合成系で、3分子のアセチル-CoAから生成されるメバロン酸を経由して、イソプレノ骨格が生成・伸長していく (Fig. 5)。脂肪酸の合成に用いられる酢酸-マロン酸経路もメバロン酸経路もアセチル-CoAを出発物質としているが、生成されるアルキル化合物の水素同位体組成は大きく異なる。これは真核生物でもバクテリアでも共通してみられる現象である。バクテリアの場合、イソプレノイド (ホパノイド、スクアレン、ステロール) の水素同位体比の方が脂肪酸のそれよりも60から190%程低い値を示す (Sessions et al., 2002)。これは、脂肪酸では水素交換 (ケト-エノール) 反応によるためと考えられているが、要因はよくわかっていない。

4.3.3. 非メバロン酸経路 (Methylerythritol phosphate pathway, MEP pathway)

1993年にRohmerらによって非メバロン酸経路が発見されるまで、生物によるイソプレノイドの生合成はメバロン酸によるものと考えられていた。しかし、現在までに、真核生物から原核生物に至る多くの生物において非メバロン酸経路によるイソプレノイドの生成が報告されている (Lange et al., 2001)。非メバロン酸経路はピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸 (GAP) が縮合し、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を経て、イソプレノ骨格 (IPP) が生成される (Fig. 5)。グルコースを炭素源としてみた場合、上述のメバロン酸経路では、生成されるイソプレノイド鎖の炭素はグルコースの1 (6) 位と2 (5) 位の炭素に由来する。それに対し、非メバロン酸経路では3 (4) 位の炭素も寄与する事が大きな特徴である。

5. 特徴的なバイオマーカーの同位体組成

細胞膜を構成する両親媒性脂質はバクテリアでは一般的に、脂肪酸とグリセロールとのエステル結合であり、それらが形成するリン脂質二重膜にホパノールまたはステロールが膜の強化材として

埋め込まれている。それに対して、アーキアでは2つのフィチル基がグリセロールとエーテル結合したアーキオールやフィチル基の側鎖にヒドロキシル基がついたヒドロキシアーキオール、フィタンが Head to Head で結合したビフィタンの両端がグリセロールとエーテル結合を形成したテトラエーテル脂質 (Glycerol dialkyl glycerol tetraethers, GDGTs またはカルドアーキオール, Caldarchaeol) が二重膜を構成している。その他に、バクテリアの場合にはホパン炭化水素, アーキアの場合には鎖状イソプレノイド炭化水素 (クロセタンや PMI) が存在する。

5.1. バクテリア

5.1.1. 脂肪酸

バクテリアの脂肪酸の炭素数, 不飽和度とその位置, および分岐・環構造は非常に多岐にわたる。一般的なものには C₁₆ の飽和脂肪酸 (パルチミン酸), C₁₈ の 1 不飽和脂肪酸 (オレイン酸, C_{18:1}) があるが, 真核生物中にも広く存在するため, 指標性は低い。一般にバクテリアが生成する脂肪酸は真核生物のものよりも比較的短鎖で C₁₃ から C₁₈ が主要である。その中でバクテリアの指標として用いられているものには, 18:1 ω 7 (ω n は二重結合が脂肪酸の ω (n) 末端から何個目の炭素にあるかを示す), trans-16:1 ω 7, trans-18:1 ω 7, 15:1 ω 6 or ω 8, 17:1 ω 6 or ω 8, Iso-, anteiso-脂肪酸 (C₁₃-C₁₇), iso-15:1, iso-17:1 ω 8 などがある。また, 特定のバクテリアのバイオマーカーとしては, 硫酸還元菌に特有なメチル側鎖をもつ脂肪酸 (iso-17:1 ω 7; 10-methyl 16:0) や, シクロプロピル基をもつ脂肪酸 cy-17:0, cy-19:0, 水素酸化バクテリアに特有な 20:1 がある (Killops and Killops, 2005)。

脂肪酸バイオマーカーの構造だけで, 起源生物や代謝活動を特定するには限りがあるが, 安定炭素・水素同位体比を用いることによって, より詳細に微生物生態系を考察できるだろう。例えば, 硫酸還元菌は堆積物表層の有機物の分解に大きく関与し, 従属栄養的に活動しているが, ある種の硫酸還元菌は独立栄養的にも活動でき, 独立栄養モードの硫酸還元菌はアセチル-CoA 経路によって CO₂ を固定するため, 従属栄養モードよりも $\delta^{13}\text{C}$ 値が 28% 程低くなる (Londry and Des Marais,

2003)。また, 嫌氣的メタン酸化が活発な堆積物中からは, メタン由来の炭素を取り込んだ硫酸還元菌のバイオマーカー (10-methyl 16:0, cy-17:0) で, -100% 以下のものが報告されている (Hinrichs et al., 2000) 一方, 逆 TCA 回路を用いる場合は, 同じ炭素源でもカルビン回路によるものよりも, 30% 以上高い値なる (Naraoka et al., 2010, Fig. 6)。

5.1.2. ホパノイド

C₃₀ の環状イソプレノイド骨格を持つトリテルペノイド (Fig. 7) で, 主にバクテリアに見出されることからバクテリアバイオマーカーとして用いられている。細胞内では細胞膜に存在し, 真核生物のステロールのように細胞膜に安定性と堅牢性を与えると考えられている。生合成過程もステロイドと似ており, スクアレン (C₂₅ 鎖状イソプレノイド) の環化によってホパン骨格が生成され, それに糖由来の側鎖が C₂₉ の位置に付加して生合成される。培養菌体からはホパン側鎖に最大で 6 つの水酸基やアミノが付いたバクテリオホパンポリオール (BHPs) やジプロプロテロール, ジプロプロテンが多く見出される。一般に, ホパノイドは

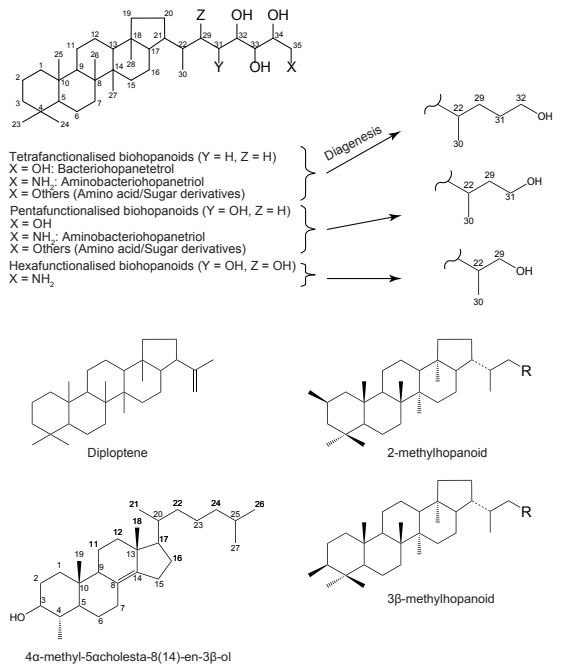


Fig. 7. Bacterial biomarkers (hopanoids and steroid).

好気性のバクテリアに特有であると考えられてきたが、近年では嫌氣的バクテリアからの報告もある (Pancost et al., 2001; Härtner et al., 2005)。BHPs は細胞の死後、分解によって官能基が脱離するため、官能基を有するもの(生物体内に存在するもの)は特にバイオホパノイドと呼ばれ、それらの分解産物のホパノイドであるジオホパノイドと区別されている。堆積物中での分解過程によって、BHPs はホパノール、ホパン酸、ホペン、ホパンという順に変化して行く。BHPs の中でも、官能基が5あるいは6つ付いた物は C₃₀、C₃₁ ジオホパノイドの起源分子であり、バクテリオホパンテトロール (BHT) は C₃₂ ジオホパノイドの起源分子と考えられている (Innes et al., 1997)。バクテリオホパンポリオールや、ジプロプテンは多くのバクテリアが共通して持つため、バイオマーカーとしての指標性は低いが、安定同位体比によって起源生物を推定することができる。例えば、ジプロプテンの起源生物としては、シアノバクテリア、アンモニア酸化バクテリア、好氣的メタン酸化バクテリアなどが知られているが、シアノバクテリアによるジプロプテン合成時の同位体分別は 27%程である (Sakata et al., 1997)。一方、水柱の酸化還元境界に生息するアンモニア酸化バクテリアは $\delta^{13}\text{C}$ 値の低い CO₂ を固定した場合 -30% よりも低くなり (Sakata et al., 2008)、好氣的メタン酸化バクテリアはメタン由来の炭素を取り込むため、ジプロプテンなどの脂質の炭素同位体比は微生物起源のメタンの同位体組成を反映して -70%ほどまで低くなり得る (Jahnke et al., 1995; Elvert et al., 2000)。

第四与那国海丘や水曜海山の熱水噴出孔周辺に生息する深海ヒバリ貝の鰓には好氣的メタン酸化バクテリアが共生しているが、鰓から抽出されたジプロプテンはメタンの同位体組成(それぞれ -26.4% と -48%)、好氣的メタン酸化バクテリア特有の炭素固定時の同位体分別を反映してそれぞれ、-34.3% および -60.5% であった (Naraoka et al., 2008)。

また、特定のバクテリアのバイオマーカーとなるホパノイドには好氣的メタン酸化バクテリアや *Acetobacter* が持つ 3 β -メチルホパノイド (Rohmer et al., 1984; Neunlist and Rohmer, 1985; Zundel and Rohmer, 1985) やシアノバクテリアのもつ 2-メチルホパノイド (Summons et al., 1999) などがある。

5.1.3. ステロイド

一般的にはステロール類は真核生物のバイオマーカーとされているが、何種かのバクテリアにもステロールの存在が知られている。例えば、好氣的メタン酸化バクテリア (*Methylococcus capsulatus* など) からは 4,4-dimethyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol, 4,4-dimethyl-5 α -cholesta-8(9),24-dien-3 β -ol, 4 α -methyl-5 α -cholest-8(9)-en-3 β -ol, 4 α -methyl-5 α -cholesta-8(9),24-dien-3 β -ol, 5 α -cholesta-8(9),24-dienol などのメチルステロール類が (Bird et al., 1971; Summons et al., 1994)、シアノバクテリアからは 24-ethyl-cholest-7-enol, 24-ethyl-cholesta-7,22-dienol, 24-ethyl-cholesta-5,7,22-trienol, 24-ethyl-cholesta-5,22-dienol, 24-ethyl-cholesta-5,7-dienol, 24-ethyl-cholest-5-enol などの 24-エチルコレステロール類が報告されている (DeSousa and Nes, 1968; Volkman; 2003)。しかしながら、一般にバクテリア中に含まれるステロイドは真核生物のそれに比べて含有量が極めて小さく、特にシアノバクテリアのステロイド (0.03% dry weight, Hai et al., 1996) は他の微生物や実験操作中の汚染説があり、議論の多いところである (Volkman, 2003)。

また、バクテリア起源のステロイドの同位体比の報告はほとんどなく、好氣的メタン酸化バクテリアに限られる。メタン酸化バクテリア由来のステロイドの $\delta^{13}\text{C}$ 値は他の脂質バイオマーカーそれと同様にメタンの同位体組成と、大きな同位体分別を反映して -70%程まで低くなる。特徴的な構造 (4-methyl-) と同位体組成は好氣的メタン酸化バクテリアのよいバイオマーカーとなる (Schouten et al., 2001)。

5.2. アーキア

5.2.1. クロセタン & PMI

クロセタンは C₁₀ のイソプレノイド鎖が Tail-to-Tail (Fig. 8 参照) で結合した C₂₀ のイソプレノイド炭化水素であり、現代および過去のメタン湧水や泥火山から見つかっている (Elvert et al., 2000; Pacost et al., 2000)。アリューシャン沈み込み帯の堆積物中からはクロセタンの 1 及び 2 不飽和体 (クロセテン) も発見されている。クロセタンとその不飽和物の炭素同位体比は -100%前後と非常に低いことから、難培養性嫌氣的メタン酸化

アーキア (anaerobic methanotroph, ANME) 起源であると考えられている (例えば Elvert et al., 2000)。ANME は系統解析によって ANME-1, -2, -3 に分類されるが、クロセタンは黒海の微生物マットにおいて、主に ANME-2 によって構成される部分から多量に見いだされていることから、特に ANME-2 のバイオマーカーとして用いられている (Blumenberg et al., 2004)。

2,6,10,15,19-pentamethyleicosane (PMI) は Tail-to-Tail 型の C₂₅ イソプレノイド炭化水素であり、メタン生成アーキアのバイオマーカーであることが広く知られている (Holzer et al., 1979; Tornabene et al., 1979; Risatti et al., 1984; Londry et al., 2008)。さらに、嫌気的メタン酸化が活発な堆積物においてクロセタンと同等の炭素同位体比をもつ PMI が見いだされることから、ANME のバイオマーカーとしても用いられている (Elvert et al., 2000, Nieman and Elvert, 2008)。その他の起源として、海洋堆積物中の PMI の $\delta^{13}\text{C}$ 値 (-28 to -24‰) が藻類のバイオマーカーであるリコパンのものに近いことから藻類由来 (Freeman et al., 1994; Kohnen et al., 1992) の報告がある。メタン生成アーキアによる PMI 合成時の同位体分別は -5.2 to 47‰ であり、メタン生成経路 (CO₂ 還元型, 酢酸発酵型, メチル基栄養型) や基質量, 温度, 成長段階により変化

する (Summons et al., 1998; Conrad, 2005; Londry et al., 2008)。

5.2.2. アーキオール

アーキオール (2,3-di-*O*-phytanyl-*sn*-glycerol) はフィトールがグリセロールの2位と3位にエーテル結合で結合したジエーテル型の膜脂質で (Fig. 8), 多くのアーキアが普遍的に用いているため、様々な環境下で見いだされる。そのため、アーキオール単体では特定のアーキアのバイオマーカーとはなり得ないが、その炭素同位体比には起源生物の生息環境や代謝経路などの情報が保存されている。例えば、嫌気的メタン酸化が活発な環境ではメタンのもつ低い同位体比を反映して -120‰ 程まで軽くなる (Hinrichs et al., 2000)。一方、Lost city では、メタン生成アーキア由来と考えられる非常に ¹³C に富んだアーキオール (最大で +7‰) が発見されている。ここでは、メタン生成の基質となる DIC が ¹³C に富み、かつ、濃度が低いいため、メタン生成時 (および脂質合成時) の同位体分別が小さくなるためだと考えられている (Bradley et al., 2009)。

5.2.3. ヒドロキシアーキオール

ヒドロキシアーキオールはグリセロール骨格の2位または3位に結合したイソプレノイド鎖 (C₂₀) に水酸基が付いたジエーテル型の膜脂質で *sn*-2-hydroxyarchaeol と *sn*-3-hydroxyarchaeols がある (Fig. 8)。これらのヒドロキシアーキオールは培養可能なアーキアの中ではメタン生成アーキアから見つかっている (Koga et al., 1998)。メタン生成アーキアによるヒドロキシアーキオール合成時の同位体分別は最大 45‰ 程であるが、PMI と同様に様々な要因により大きく変化する (Shouten et al., 2001; Pancost and Sinninghe Damste, 2003; Londry et al., 2008)。また、嫌気的メタン酸化が活発な堆積物中で -100‰ よりも低い同位体組成のヒドロキシアーキオールが見つかっていることから ANME も持っていると考えられている。

5.2.4. グリセロールジアシルグリセロールテトラエーテル (Glycerol Dialkyl Glycerol Tetraethers, GDGTs)

GDGTs は炭素数 40 からなる 2 本のイソプレノイド鎖 (ピフィタン) が 2 つのグリセロールと

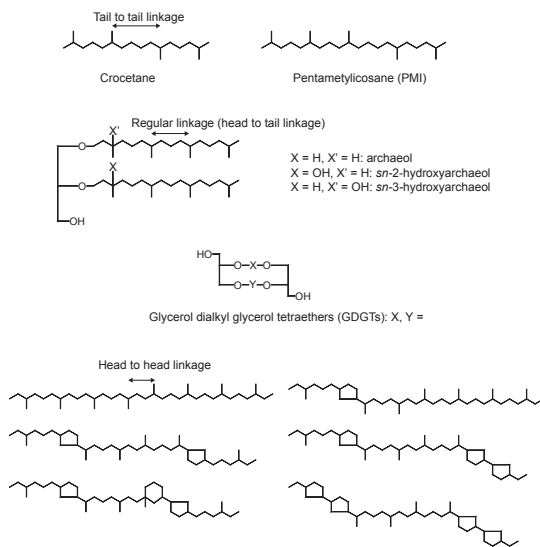


Fig. 8. Archaeal biomarkers.

エーテル結合で結合した脂質であり、アーキアの膜脂質の構成要素である。生体内ではグリセロールのヒドロキシル基に糖脂質やリン脂質などの極性基がついており、GDGTをCore lipidsと呼ぶのに対し、これらをIntact polar lipidsと呼ぶ。GDGT中のイソプレノイド鎖には最大で4つの5員環または6員環が含まれ、特に*Sulfolobus*などの好熱性のアーキアの膜脂質に多く見られるが(DeRosa and Gambacorta, 1988)、海洋性クレンアーキオータ(中温菌)のGDGTsにも最大で3つのシクロアルカンを含むイソプレノイド鎖が見つかっている(Schouten et al, 1998; Blumenberg et al., 2004)。特に、シクロヘキサンを含むイソプレノイドは海洋性クレンアーキオータのバイオマーカー、クレンアーキオールを構成する重要なイソプレノイド鎖である(Sinnge Damsté et al., 2002)。

GDGTsの $\delta^{13}\text{C}$ 値は一般的に、GDGTsを化学的に分解し、ピフィタンの同位体比として表される(Schouten et al., 1998, Kaneko et al., 2010)。ピフィタンの同位体比はアーキアの炭素源や代謝経路を反映し、従属栄養アーキア由来では -20% から -30% (Schouten et al., 1998, Biddle et al., 2006)、ANME由来では、すでに述べたイソプレノイド脂質のように低い $\delta^{13}\text{C}$ 値を持ったの非環状および環状ピフィタン(-70% から -100%)が黒海、地中海、南海トラフから報告されている(Pancost et al., 2001; Blumenberg et al., 2004; Oba et al., 2006; Niemann and Elvert., 2008)。一般的に、メタン生成菌由来のGDGTの $\delta^{13}\text{C}$ 値はメタン生成時の大きな同位体分別を反映して低い値を示すと考えられているが、現在のところ、培養実験、天然環境のメタン生成アーキア由来のピフィタンの $\delta^{13}\text{C}$ 値は報告されていない。

アーキアの膜脂質の水素同位体比はこれまで全く報告がなかったが、近年我々が開発したGDGTsの水素同位体比測定法(Kaneko et al., 2010)によって測定が可能になった。*Sulfolobus*を従属的に培養した菌体を用いてGDGTs構造中のピフィタン δD 値を調べたところ、0から4つのシクロペンタンを持つピフィタンが検出され、その δD 値はシクロペンタンの数が増えるとともに高くなり、最大で50%の差を生じた(Fig. 9)。培養に用いた H_2O の同位体比は -66% であり、脂質合成時

の同位体分別は -213% から -161% であった。この同位体分別の大きさは従属栄養バクテリアよりもむしろ、化学合成バクテリアや藻類のものに近い。また、イソプレノイド鎖の生合成時には中間生成物として多不飽和なピフィテンが生成されるが、シクロペンタンを2重結合とみなすと、シクロペンタンの数と水素同位体比の関係は植物のフィトール形成時にみられるフィトール前駆体の段階的な水素付加時の同位体分別(Chikaraishi et al., 2009)と不飽和度による同位体的挙動が似ている。

6. 微生物バイオマーカーと地球環境研究

脂質バイオマーカーの同位体組成は、起源生物や、その生物生理、生育環境を反映して変化するため、有機分子が生成された場所の環境を紐解く情報を保持している。水柱の酸化還元境界のように酸素と還元物が存在する場所では、アンモニア酸化バクテリアや硫酸酸化バクテリアなどの化学合成バクテリアや好氣的メタン酸化バクテリアなどが生息している。これまで述べてきたように、これらのバクテリアは炭素固定時の同位体分別や、炭素基質の同位体組成に加え、溶存 CO_2 の炭素同位体比(上部の酸化層での有機物分解によって有機物由来の CO_2 が排出され、結果として CO_2 の $\delta^{13}\text{C}$ 値が低くなる)を反映して、バイオマーカー分子の $\delta^{13}\text{C}$ 値が顕著に低くなる。

例えば、カリアコ海盆や黒海の水柱では、酸

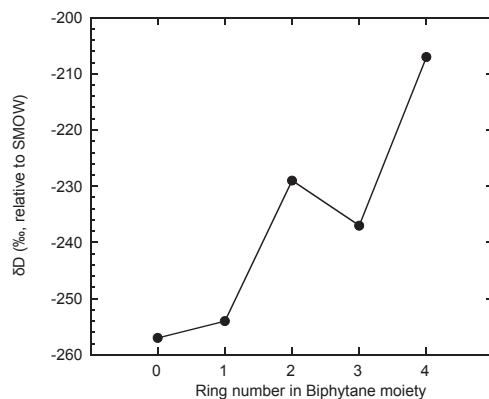


Fig. 9. Hydrogen isotopic compositions of biphytane moieties derived from GDGTs in *Sulfolobus* culture.

化還元境界付近で低い $\delta^{13}\text{C}$ 値 (-40%) のジプロプテンの濃度が上昇し、さらに沈降有機物の $\delta^{13}\text{C}$ 値も低くなっていることから、アンモニア酸化細菌による寄与が考えられる (Freeman et al., 1994; Sakata et al., 2008)。また、過去 2 万 5 千年の日本海堆積物コア中におけるジプロプテンの炭素同位体比記録では、現在から 1 万年前くらいまでのジプロプテンの炭素同位体比は -24% 程 (シアノ細菌由来と考えられる) であるのに対し、1 万年から 1 万 5 千年前にかけてその同位体比は -57% まで急激に低くなる (Yamada et al., 1997)。これは日本海が成層化し、深海底が還元的になった時期に対応しており、好氣的メタン酸化細菌による寄与が大きくなっていることを示している。これらの研究結果はバイオマーカー分子の同位体比が、古環境変動の解析に有効であることを示している。

同位体分別の大きさは、成長速度や生育温度、酵素反応の可逆性などによっても変化する。一般に、生物の増殖は遅滞期、対数増殖期、定常期、減衰期 (死滅期) の 4 つのステージに分けられる。好氣的メタン酸化細菌 (*Methylococcus capsulatus*) では対数増殖期の初期で基質とバイオマスの間の同位体分別が最も大きくなり (34%)、定常期では最も小さく (16%) なることが報告されている。これは、メタンの酸化に用いる酵素、メタンモノオキシゲナーゼ (MMO) が成長段階に応じて particulate MMO から可溶性 MMO に変化し、且つそれぞれの酵素によって引き起こされる同位体分別が違うことが要因とされている (Summons et al., 1994)。一方、メタン生成アーキアの場合、メタン生成時の同位体分別は遅滞期で最も小さく ($2-4\%$)、対数増殖期で増加し、定常期で一定 ($65-75\%$) になる事が報告されている (Botz, et al., 1996; House et al., 2003)。また、温度によるメタン生成時の同位体分別 (定常期) の変化は、メタンと CO_2 の間の熱力学的な同位体平衡ライン上に乗り、海洋堆積物中に見積もられているメタン生成時の同位体分別ともよく一致する (Whiticar et al., 1986; Botz et al., 1996)。このことから、成長段階によって同位体分別は大きく変化するが、メタン生成アーキアの場合、培養実験における定常期の同位体分別の大きさが海洋堆積物

中のメタン生成の同位体分別を反映していると考えられる。さらに、メタン生成時および脂質合成時の同位体分別は水素濃度によっても 30% 以上変化することが報告されている (Valentine et al., 2004; Londry, et al., 2008)。この要因として、 CO_2 を H_2 で還元するときの生成自由エネルギーが酵素反応の可逆性をコントロールしている事が提案されており、水素濃度が低い状態では、酵素反応に可逆性が生じ、結果として最大の同位体分別が生じる。

このように、炭素固定時の同位体分別およびバイオマーカーの同位体組成を変化させる要因には多くの環境因子を含み、培養実験で得られる結果をどのように天然試料に応用するかは注意が必要であるが、逆に言えば、バイオマーカーがこれら多くの情報を保存しているポテンシャルを秘めていることになる。

7. まとめ

有機地球化学にとって、重要なテーマである石油・石炭の化石燃料の分布や生成過程の解明は、太陽のエネルギーを利用する藻類や陸上植物などの独立栄養光合成真核生物が、地球の炭素循環や有機物生成に大きく関与しているという基本概念に則ったものであった。これら以外の細菌・アーキアの活動も地球環境を支配する大切な要素であり、深層生物圏などが全地球上のバイオマス自体にも寄与していると考えられている。物質循環をコントロールする要因として原核生物の役割を考えると、脂質バイオマーカーの炭素・水素同位体比は有効な手段となる。

本稿では原核生物の脂質バイオマーカーとその同位体的特徴、同位体比を変化させる要因について、これまで分かっていることをできるだけ簡潔にまとめたつもりである。しかしながら、原核生物の脂質バイオマーカーとその同位体的研究はまだ始まったばかりであり、未成熟な分野である。例えば、地球上の原核生物の殆どは難培養性であり、代謝経路や、生物地球化学的役割が不明である。培養技術の進歩とともに、バイオマーカーの同位体組成に関する新しい知見を増やしていくことが重要である。また、Fig. 3-5 の代謝・生合成経

路はかなり簡略化あるいは経路を切り離して描いたものであり、実際にはもっと複雑な中間生成物や反応を介した経路が存在する。例えば、アセチル-CoA やピルビン酸のインプットやアウトプットは多岐にわたり、その経路の分岐点における炭素フローの変化は下流の生成物の同位体組成に大きく関与する (Hayes, 2001)。このような原核生物における生化学的反応経路内の同位体分別に関する研究はほとんどないが、同位体分別を変化させる要因を考える上で重要である。

これらの問題は培養実験を基礎にして解決すべき問題であるのに対して、天然環境における原核生物の活動は、培地のような原核生物によって最適な環境とは異なると考えられ、代謝基質濃度や他の生物との相互作用によっても制約を受ける。そのため、培養実験で得た情報をいかに用いるかは大きな問題である。例えばエネルギー的な制約は生体内での物質の循環や上で述べたような酵素の可逆性を変化させるだろう。最近の有機地球化学分野の研究において、アーキアは海洋堆積物中の膜脂質をリサイクリング (サルベージ) することが報告された (Takano et al., 2010)。微生物学の世界ではこのサルベージ経路が以前から報告されており (Silbert, et al., 1968; Razin, 1975; Ischebeck et al., 2006; Kitatani et al., 2008), 自然界では普遍的に起こっていると考えられる。このような原核生物の挙動は、環境中のバイオマーカーの同位体組成に大きく影響する可能性があり、サルベージが起こる条件と新規合成 (de novo synthesis) との割合を知る必要がある。

このように、多くの解決すべき重要問題が存在するが、これらはバイオマーカーとその同位体組成の存在意義を揺るがすものではなく、むしろ同位体分析の技術を持って解決すべき問題であると考えている。

謝 辞

まず、本総説を書く貴重な機会を与えてくださった日本有機地球化学会の皆様に感謝申し上げます。また、本総説の査読、改稿にあたり、多くの貴重なご意見やアドバイスを頂いた力石嘉人博士、高野淑識博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Biddle J.F., Lipp J.S., Lever M.A., Lloyd K.G., Sørensen K.B., Anderson R., Fredricks H.F., Elvert M., Kelly T.J., Schrag D.P., Sogin M.L., Brenchley J.E., Teske A., House C.H. and Hinrichs K.-U. (2006) Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc. National Acad. Sci.* **103**, 3846-3851.
- Bird C.W., Lynch J.M., Pirt F.J., Reid W.W. (1971) Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown on methane. *Nature* **230**, 473-474.
- Blumenberg M., Seifert R., Reitner J., Pape T. and Michaelis W. (2004) Membrane lipid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proc. National Acad. Sci.* **101**, 11111-11116.
- Botz R., Pokojski H.-D., Schmitt M. and Thomm M. (1996) Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO₂ reduction. *Org. Geochem.* **25**, 255-262.
- Bradley A.S., Hayes J.M. and Summons R.E. (2009) Extraordinary ¹³C enrichment of diether lipids at the Lost City Hydrothermal Field indicates a carbon-limited ecosystem. *Geochim. Cosmochim. Acta* **73**, 102-118.
- Bühning S.I., Smittenberg R.H., Sachse D., Lipp J.S., Golubic S., Sachs J.P., Hinrichs K.-U. and Summons R.E. (2009) A hypersaline microbial mat from the Pacific Atoll Kiritimati: insight into composition and carbon fixation using biomarker analyses and a ¹³C-labeling approach. *Geobiology* **7**, 308-323.
- Chikaraishi Y. and Naraoka H. (2007) δ¹³C and δD relationships among three n-alkyl compound classes (n-alkanoic acid, n-alkane and n-alkanol) of terrestrial higher plants. *Org. Geochem.* **38**, 198-215.
- Chikaraishi Y., Tanaka R., Tanaka A. and Ohkouchi N. (2009) Fractionation of hydrogen isotopes during phytol biosynthesis. *Org. Geochem.* **40**, 569-573.
- Conrad R. (2005) Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotope signatures: a review and a proposal. *Org. Geochem.* **36**, 739-752.
- DeNiro M.J. and Epstein S. (1977) Mechanism of

- carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* **197**, 261-263.
- De Rosa M. and Gambacorta A. (1988) The lipids of archaeobacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153-175.
- De Souza N.J., and Nes W.R. (1968) Sterols: Isolation from a blue-green alga. *Science*, **162**, 363.
- Elvert M., Suess E., Greinert J. and Whiticar M.J. (2000) Archaea mediating anaerobic methane oxidation in deep-sea sediment at cold seeps of the eastern Aleutian subduction zone. *Org. Geochem.* **31**, 1175-1187.
- Freeman K.H., Wakeham S.G. and Hayes J.M. (1994) Predictive isotope biogeochemistry: Hydrocarbons from anoxic marine basins. *Org. Geochem.* **21**, 629-644.
- Gelwicks J.T., Risatti J.B. and Hayes J.M. (1989) Carbon isotope effects associated with autotrophic acetogenesis. *Org. Geochem.* **14**, 441-446.
- Guy R.D., Fogel M.L. and Berry J.A. (1993) Photosynthetic fractionation of the stable isotopes of oxygen and carbon. *Plant Physiol.* **101**, 37-47.
- Hai T., Schneider B., Schmidt J. and Adam G. (1996) Sterols and triterpenoids from the cyanobacterium *Anabaena hallensis*. *Phytochemistry* **41**, 1083-1084.
- Hayes J.M. (2001) Fractionation of the isotopes of carbon and hydrogen in biosynthetic processes. *Rev. Mineral. Geochem.* **43**, 225-278.
- Härtner T., Straub K.L. and Kannenberg E. (2005) Occurrence of hopanoid lipids in anaerobic *Geobacter* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**, 59-64.
- Hinrichs K.-U., Summons R.E., Orphan V., Sylva S.P. and Hayes J.M. (2000) Molecular and isotope analysis of anaerobic methane-oxidizing communities in marine sediments. *Org. Geochem.* **31**, 1685-1701.
- Holzer G., Oró J. and Tornabene T.G. (1979) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of neutral lipids from methanogenic and thermoacidophilic bacteria. *J. Chromatogr.* **186**, 795-809.
- House C.H., Schopf J.W. and Stetter K.O. (2003) Carbon isotopic fractionation by Archaeans and other thermophilic prokaryotes. *Org. Geochem.* **34**, 345-356.
- Innes H.E., Bishop A.N., Head I.M. and Farrimond P. (1997) Preservation and diagenesis of hopanoids in recent lacustrine sediments of Priest Pot, England. *Org. Geochem.* **26**, 565-576.
- Ischebeck T., Zbierzak A.M., Kanwischer M. and Dörmann P. (2006) A salvage pathway for phytol metabolism in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**, 2470-2477.
- Jahnke L.L., Eder W., Huber R., Hope J.M., Hinrichs K.-U., Hayes J.M., Des Marais D.J., Cady S.L. and Summons R.E. (2001) Signature lipids and stable carbon isotope analyses of Octopus spring hyperthermophilic communities compared with those of *Aquificales* representatives. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5179-5189.
- Jahnke L.L. and Nichols P.D. (1986) Methyl sterol and cyclopropane fatty acid composition of *Methylococcus capsulatus* grown at low oxygen tensions. *J. Bacteriol.* **167**, 238-242.
- Jahnke L.L., Summons R.E., Dowling L.M. and Zahiralis K.D. (1995) Identification of methanotrophic lipid biomarkers in cold-seep mussel gills: Chemical and isotopic analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 576-582.
- Jahnke L.L., Summons R.E., Hope J.M. and Des Marais D.J. (1999) Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria II: The effects of physiology and environmental parameters on the biosynthesis and isotopic signatures of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* **63**, 79-93.
- Kaneko M., Kitajima F. and Naraoka H. (2010) Stable hydrogen isotope measurement of archaeal ether-bound hydrocarbons. *Org. Geochem.* **42**, 166-172.
- Killops S and Killops V. (2005) Introduction to Organic Geochemistry 2nd edition, BLACKWELL PUBLISHING, Australia.
- Kitatani K., Idkowiak-Baldys J. and Hannun Y.A. (2008) The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell. Signalling* **20**, 1010-1018.
- Koga Y., Morii H., Akagawa-M.M and Ohga M. (1998) Correlation of polar lipid composition with 16S

- rRNA phylogeny in methanogen. Further analysis of lipid component parts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 230-236.
- Kohnen M.E., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S., de Leeuw J.W., Merritt D.A. and Hayes J.M. (1992) Recognition of paleobiochemicals by a combined molecular sulfur and isotope geochemical approach. *Science* **256**, 358-362.
- Lange B.M., Rujan T., Martin W. and Croteau R. (2001) Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. National. Acad. Sci.* **97**, 13172-13177.
- Londry K.L., Dawson K.G., Grover H.D., Summons R.E. and Bradley A.S. (2008) Stable carbon isotope fractionation between substrates and products of *Methanosarcina barkeri*. *Org. Geochem.* **39**, 608-621.
- Londry K.L. and Des Marais D.J.D. (2003) Stable carbon isotope fractionation by sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2942-2949.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V. and Clark D.P. (2009) Brock Biology of Microorganisms 12th edition. Pearson Education, Inc., San Francisco.
- Melzer E. and Schmidt H.-L. (1987) Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *J. Biol. Chem.* **262**, 8159-8164.
- 奈良岡 浩 (2004) 有機分子の同位体組成, 地球化学講座 4, 有機地球化学, PP. 201-231, 培風館.
- Naraoka H., Uehara T., Hanada S. and Kakegawa T. (2010) $\delta^{13}\text{C}$ - δD distribution of lipid biomarkers in a bacterial mat from a hot spring in Miyagi Prefecture, NE Japan. *Org. Geochem.* **41**, 398-403.
- Naraoka H., Naito T., Yamanaka T., Tsunogai U. and Fujikura K. (2008) A multi-isotope study of deep-sea mussels at three different hydrothermal vent sites in the northwestern Pacific. *Chem. Geol.* **255**, 25-32.
- Neunlist S. and Rohmer M. (1985) Novel hopanoids from the methylotrophic bacteria *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas methanica*. *Biochem. J.* **231**, 635-639.
- Niemann H. and Elvert M. (2008) Diagnostic lipid biomarker and stable carbon isotope signatures of microbial communities mediating the anaerobic oxidation of methane with sulphate. *Org. Geochem.* **39**, 1668-1677.
- Oba M., Sakata S. and Tsunogai U. (2006) Polar and neutral isopranyl glycerol ether lipids as biomarkers of archaea in near-surface sediments from the Nankai Trough. *Org. Geochem.* **37**, 1643-1654.
- Pancost R., Bouloubassi I., Aloisi G., Sinninghe Damsté J.S. and the Medinaut Shipboard Scientific Party (2001) Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Org. Geochem.* **32**, 695-707.
- Pancost R., Sinninghe Damsté J.P., de List, S., van der Maarel M.J.E.C., Gottschal J.C. and the medinaut shipboard scientific party (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediment by a consortium of methanogenic Archaea and Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1126-1132.
- Pancost R. and Sinninghe Damsté J.P. (2003) Carbon isotopic composition of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse setting. *Chem. Geol.* **195**, 29-58.
- Razin S. (1975) Cholesterol incorporation into bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **124**, 570-572.
- Risatti J.B., Rowland S.J., Yon D.A. and Maxwell J.R. (1984) Stereochemical studies of acyclic isoprenoids—XII. Lipids of methanogenic bacteria and possible contributions to sediments. *Org. Geochem.* **6**, 93-104.
- Rohmer M., Bouvier-Nave P. and Ourisson G. (1984) Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1137-1150.
- Rohmer M., Knani M., Siminin P., Sutter B. and Sahn H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**, 517-524.
- Sakata S., Hayes J.M., McTaggart A.R., Evans R.A., Leckrone K.J. and Togasaki R.K. (1997) Carbon isotopic fractionation associated with lipid biosynthesis by a cyanobacterium: Relevance for interpretation of biomarker records. *Geochim.*

- Cosmochim Acta* **61**, 5379-5389.
- Sakata S., Hayes J.M., Rohmer M., Hooper A.B. and Seemann M. (2008) Stable carbon-isotope compositions of lipids isolated from the ammonia-oxidizing chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *Org. Geochem.* **39**, 1725-1734.
- Schoell M., Hwang R.J., Carlson R.M.K. and Welton J.E. (1994) Carbon isotopic composition of individual biomarker in gilsonites (Utah). *Org. Geochem.* **21**, 673-683.
- Schouten S., Hoefs M.J.L., Koopmans M.P., Bosch H.-J. and Sinninghe Damsté J.P. (1998) Structure characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound and acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Org. Geochem.* **29**, 1305-1319.
- Schouten S., Rupstra W.I.C., Kok M., Hopmans E.C., Summons R.E., Volkman J.K. and Sinninghe Damsté J.S. (2001) Molecular organic tracers of biogeochemical processes in a saline meromictic lake (Ace Lake). *Geochim. Cosmochim. Acta* **65** 1629-1640.
- Sessions A.L., Jahnke L.L., Schimmelmann A. and Hayes J.M. (2002) Hydrogen isotope fractionation in lipids of the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **66**, 3955-3969.
- Sinninghe Damsté J.P., Schouten S., Hopmans E.C., van Duin A.C.T. and Geenevasen J.A.J. (2002) Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J. Lipid. Res.* **43**, 1641-1651.
- Silbert D.F., Ruch F. and Vagelos P.R. (1968) Fatty acid replacements in a fatty acid auxotroph of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **95**, 1685-1665.
- Summons R., Franzmann P.D. and Nichols P.D. (1998) Carbon isotopic fractionation associated with methylotrophic methanogenesis. *Org. Geochem.* **28**, 465-475.
- Summons R., Jahnke L.L., Hope J.M. and Logan G.A. (1999) 2-Methylhopanoids as biomarker for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**, 554-557.
- Summons R.E., Jahnke L.L. and Roksandic Z. (1994) Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria: Relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers. *Geochim. Cosmochim. Acta* **58**, 2853-2863.
- Stumm W. and Morgan J.J. (1996) Aquatic Chemistry, Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Nomaki H., Morono Y., Inagaki F., Kitazato H., Hinrichs K.-W. and Ohkouchi N. (2010) Sedimental membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nat. Geosci.* **3**, 858-861.
- Tornabene T.G., Langworthy T.A., Holzer G. and Oró J. (1979) Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidophilic "archaeobacteria". *J. Mol. Evol.* **13**, 73-83.
- Valentine D.L., Chidthaisong A., Rice A., Reeburgh W.S. and Tyler S. (2004) Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens. *Geochim. Cosmochim. Acta* **68**, 1571-1590.
- Van der Meer M.T.J., Schouten S. and Sinninghe Damsté J.P. (1998) The effect of the reversed tricarboxylic acid cycle on the ¹³C contents of bacterial lipids. *Org. Geochem.* **28**, 527-533.
- Van der Meer M.T.J., Schouten S., Rijpstra W.I.C., Fuchs G. and Sinninghe Damsté J.S. (2001a) Stable carbon isotope fractionations of the hyperthermophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula*. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**, 67-70.
- Van der Meer M.T.J., Schouten S., van Dongen B.E., Rijpstra W.I.C., Fuchs G., Sinninghe Damsté J.S., de Leeuw J.W. and Ward D.M. (2001b) Biosynthetic controls on the ¹³C contents of organic components in the photoautotrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Biol. Chem.* **276**, 10971-10976.
- Volkman J.K. (2003) Sterols in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 495-506.
- Whiticar M.J., Faber E. and Schoell M. (1986)

- Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO₂ reduction vs. acetate fermentation—Isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta* **50**, 693-709.
- Yamada K., Ishiwatari R., Matsumoto K. and Naraoka H. (1997) $\delta^{13}\text{C}$ records of diploptene in the Japan Sea sediment over the past 25 kyr. *Geochem. J.* **31**, 315-321.
- Zhang C., Huang Z., Li Y.-L., Romanek C.S., Mills G.L., Gibson R.A., Talbot H.M., Wiegel J., Noakes J., Culp R. and White D.C. (2007) Lipid biomarkers, carbon isotopes, and phylogenetic characterization of bacteria in California and Nevada hot springs. *Geomicrobiol. J.* **24**, 519-534.
- Zhang X., Gillespie A.L. and Sessions A.L. (2009) Large D/H variations in bacterial lipids reflect central metabolic pathways. *Proc. National. Acad. Sci.* **106**, 12580-12586.
- Zundel M. and Rohmer M. (1985) Prokaryotic triterpenoids. 1, 3β -Methylhopanoids from *Acetobacter* species and *Methylococcus capsulatus*. *Eur. J. Biochem.* **150**, 23-27.