

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12446

研究課題名(和文) アンビエントイオン化イオンモビリティ法によるカビ発生早期検知技術の新展開

研究課題名(英文) Development of a new ambient ionization-ion mobility spectrometric method for detecting fungal species in early growth stages

研究代表者

竹内 孝江 (Takeuchi, Takae)

奈良女子大学・自然科学系・准教授

研究者番号：80201606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧DARTイオン化質量分析法による真菌(カビ)の揮発性代謝物質のオンサイト分析法を確立した。Penicillium paneum、Fusarium solani等の古墳で見つかった4種のカビの分生子を土壌に似た貧栄養培地でin vitroで培養し、ppt～ppbの低濃度の揮発性カビ代謝物質を固相マイクロ抽出DART高分解能質量分析法により同定した。P. paneumの揮発性代謝成分の質量スペクトルには、特徴的なcaryophyllene等のプロトン付加分子及びヒドロイオン脱離分子が観測された。本研究により、DARTイオン化法がカビ代謝物質のオンサイト検出に有効であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Fungi occurring in cultural properties and the environment are problematic. Microbial volatile organic compounds (MVOC) emitted from fungi can be used as a notification of fungal growth in the environment. In this study, we developed a Direct Analysis in Real Time (DART) MVOC monitoring system. MVOC emitted from Penicillium paneum, Fusarium solani, Aspergillus fumigatus, and Aspergillus nidulans in the head-space of the flasks were directly analyzed using the DART-Orbitrap mass spectrometer. The characteristic peaks which correspond to  $[M-H]^+$  ions and  $[M+H]^+$  ions of C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> appeared in the DART mass spectra of MVOCs from Penicillium paneum and Aspergillus fumigatus with the high mass resolution mode. The peak at  $m/z$  123.0447 in the DART mass spectrum of P. paneum was assigned to benzoic acid. It was concluded that the MVOC monitoring with the DART ion source is a promising method for identifying fungal species.

研究分野：化学質量分析学 文化財環境科学

キーワード：微生物由来揮発性有機化合物 真菌 アンビエントイオン化質量分析 DART セスキテルペン イオン移動度スペクトロメトリー MVOC カビ代謝物質

### 1. 研究開始当初の背景

古文化財が微生物により損傷を受ける例が多数報告されている。キトラ古墳では、*Penicillium* 属、*Fusarium* 属などが発生したため、壁画に損傷を与えている[Kigawa et al., *Science for Conservation*, **44**, 165-171 (2005); *ibid.*, **47**, 129-134 (2008); Sano et al., *Science for Conservation*, **47**, 135-171 (2008)]。カビ(真菌)による損傷をできるだけ少なくするためには、カビの発生を迅速に検出する手法の開発、すなわち文化財保存技術の高度化が要望される。

平成 19~21 年度科学技術振興機構・先端計測機器開発・機器開発事業「文化財保全環境モニター開発—土壌由来のカビの検出」(チームリーダー:鈴木孝仁)、および平成 21~23 年度 同 事業ソフトウェア開発「IMS による土壌由来カビ検出データベースの構築」(チームリーダー:竹内孝江)の研究が行われた。これらの成果として、古墳由来のカビ 20 種から放出された「ニオイ物質(カビ臭)」のガスクロマトグラフ質量スペクトル(GC/MS)およびイオンモビリティスペクトル(IMS)のフィンガープリントデータベースを構築した。また、これらのスペクトルから高い正答率でカビ種を判定できるソフトウェアを開発した。[青木良晃、竹内孝江 *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2014), JP 2014087282 A 20140515]

### 2. 研究の目的

古墳など、一般環境中にある文化財は、カビの繁殖による損傷などのおそれがある。遺跡にある文化財の損傷を防ぐためには、カビが繁殖すると直ちに対策を講じる必要がある。本研究では、カビが発生するニオイ物質に着目した。見えないところでカビが発生しても、ニオイ物質であれば早期発見が可能であり、有効であると期待される。本研究の最終目標は、ニオイの定点観測を行い、検出されたニオイからカビ発生の診断を行い、発生したカビの予測と警報を発するシステムの構築である。研究開始時には、利用可能なこのようなシステムは未だなかった。

本研究の目的は、大気圧において前処理なしで操作できるアンビエントイオン化技術とイオンモビリティ技術を利用した新規アイデアに基づく文化財保全のためのポータブルで簡易なカビ臭検出器を開発するための新しい基礎技術を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### <カビ種と培養、揮発性代謝物質の抽出>

古墳で見つかった 3 種のカビ *Penicillium paneum*、*Fusarium solani* および *Aspergillus fumigatus* と、研究報告例が多く遺伝子配列がよく分かったカビである *Aspergillus nidulans* の 4 種のカビを研究対象とした。

カビの MVOC は培養条件に依存する。成分が既知であり古墳などの土壌と類似した

貧栄養培地である変形型 Czapek-Dox 培地を用いた。20 mL の培地を 50 mL ナス型フラスコにいれ、その容器中で、4 種のカビを 28℃ で 1~9 日間培養した。変形型 Czapek-Dox 培地については、寒天を添加した寒天培地と、寒天を添加しない液体培地の両方についてすべての実験を行い、その差を検討した。

ppt~ppb の低濃度のカビの揮発性代謝物質を固相マイクロ抽出法により濃縮抽出した。

カビ試料の個体差による影響を調べるため、少なくとも同じ試料を 3 セット以上用意し、再現性を確認した。

#### <アンビエントイオン化法の検討>

アンビエントイオン化法の 1 つである Direct Analysis in Real Time (DART) イオン源を用いた DART イオン化によっておこる反応(機構)が、Dong によってまとめられている[Yiyang Dong Ed., "Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. Principles and Practices of DART-MS", Figure 1.22, p. 26, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2018]。プロトン移動反応は最も起こりやすい反応である。まず、励起状態の He 原子が大気中の水分子と反応してラジカルカチオンの水分子ができ、これが他の水分子と反応してヒドロニウムイオン(オキシニウムイオン)を生成する。このヒドロニウムイオンがまた他の水分子と反応してプロトン付加した水クラスター(水分子数  $n=1\sim 14$  程度)を生成する。 $n=3$  が一番多く、次いで  $n=2$  が多いことが報告されている。このプロトン付加した水クラスターが反応種となって試料分子をプロトン化する。ペニングイオン化反応が起こることも報告されている。これは試料分子のイオン化エネルギーが He 原子のもつ励起エネルギーよりも低い時に起こるが、励起状態の He 原子は大気中では寿命が短いことからプロトン移動反応の方がより起こる。DART イオン源を用いると、気体、液体、固体サンプルのイオン化が可能である。さらに測定試料を大気圧下で DART イオン源にかざすだけでイオン化できる簡便な操作方法であり、 $0.1\text{ m}^3$  程度の小型であるため、持ち運びがやすく、文化財現場などのオンサイト分析に適している[J. Mitchell Wells et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1419-1424 ]

本研究では、イオン源は DART-SVP (Ion Sense 社製)を用いた。イオン源温度は 350℃ に保った。イオン化効率を上げるため、DART 質量スペクトル測定には、コロナ放電を備えた大気圧直接イオンソース AMR 社 DART-OS イオン源も使い、コロナ放電が無い場合と比較した。

#### <カビの揮発性代謝物質の構造推定>

四重極質量分析装置(LC-MS2020: 島津製作所社製)と高分解能質量分析装置(Orbitrap: Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて、DART イオン化した、カビの揮発性代謝物質の質量分析を行った。

研究代表者らは、MVOC のなかでも

$\beta$ -caryophyllene などのセスキテルペンは孢子形成時に特に生成することが見出した [T. Takeuchi et al., *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44*, 694-698]。カビが生成するセスキテルペを検知することによって、カビの発見につながる可能性がある。そこで、DART イオン源を取り付けた質量分析装置を使って土壌由来カビ代謝物である三種類のセスキテルペン (limonene, geraniol および nerol) をカビ臭物質の参照物質として、これらの DART 質量スペクトルも測定し、カビ試料のスペクトルと比較した。高分解能質量分析装置を使って各イオンの精密質量を求めることにより、各ピークの元素組成を求めた。また各イオンに由来する化合物の同定には、標準試薬を使った既知の参照化合物の DART-HRMS および衝突誘起解離 CID および HID 法によってプロトン付加分子およびヒドリドイオン脱離分子からのタンデム質量スペクトル (MS/MS) も測定し、比較することにより、カビ代謝物質の分子推定を行った

#### 4. 研究成果

##### (1) 液体培地および寒天培地の検討

液体培地培養カビの質量スペクトルには、培地成分で最も多く含まれていたグルコース由来のピークが大きく出現し、ターゲット分子の妨害ピークとなった。これを削減するために培地のグルコース含量を従来の3分の1の量まで減らした寒天培地を使用した。この培地を使用して培養したカビの揮発性代謝物質の DART イオン化質量スペクトルでは、妨害ピーク量は大きく減り、ターゲット分子由来のピークが高い強度で出現した。

##### (2) DART 質量分析測定によるカビ代謝物質の前処理法の検討

カビ培養した容器を DART イオン源にかざすだけの測定方法と、固相マイクロ抽出ファイバーを用いてカビ培養容器のヘッドスペース部分の固相マイクロ抽出操作を行ってから DART イオン源にかざして測定する方法の二つの方法を検討した。低～中極性物質の抽出に適している固相マイクロ抽出ファイバー (Sigma Aldrich 社製) による抽出操作を行った方が高い強度でターゲット分子 (カビの揮発性成分) 由来のピークをスペクトルに検出できたため、固相マイクロ抽出ファイバーを使うことにした。

##### (3) MVOC の DART 質量分析

*P. paneum* 試料のヘッドスペース部分を固相マイクロ抽出して得られた揮発性成分の正イオンモード質量スペクトルには、 $m/z$  203.1808 と  $m/z$  205.1963 に大きなピークが観測され、これらはそれぞれプロトン付加分子 [caryophyllene+H]<sup>+</sup> とヒドリドイオン脱離分子 [caryophyllene-H]<sup>+</sup> によるピークであると帰属された (Fig. 1 参照)。[Glc+Na]<sup>+</sup> も  $m/z$  203 であるが、精密質量測定の結果より [Glc+Na]<sup>+</sup> の可能性は否定された (Table 1 参照)。このことは、DART MS スペクトルに

は、ナトリウム付加分子が出現しないという今までの報告と一致していた。また培地に含まれるグルコース由来ピークが  $m/z$  149.0459 と  $m/z$  163.1339 に出現した。

プロトン付加分子 [caryophyllene+H]<sup>+</sup> を前駆イオンとして、衝突誘起解離によって得られたタンデム質量スペクトル (MS/MS スペクトル) には、フラグメントイオン C<sub>7</sub>H<sub>11</sub><sup>+</sup> と C<sub>8</sub>H<sub>13</sub><sup>+</sup> が出現した。

$m/z$  123.0447 に出現したピークは、 $\beta$ -caryophyllene のフラグメントイオン C<sub>6</sub>H<sub>15</sub><sup>+</sup> 由来ではなく、*P. paneum* が MVOC として生成するベンズアルデヒドの酸化物である安息香酸 (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>) であることが、精密質量測定の結果から推定された (Table 1 参照)。

セスキテルペン類 caryophyllene, limonene, geraniol および nerol の DART MS/MS スペクトルは似ており、DART イオン化後、共通の安定な分子構造を経てフラグメンテーションすると予想された。

以上より、簡便な DART 法を適用した分析法の開発により、caryophyllene などのカビ代謝物質を分析できることがわかった。

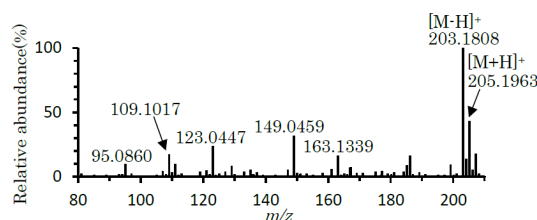


Fig. 1 DART mass spectrum of MVOCs emitted from *Penicillium paneum*

Table 1 測定精密質量 (Accurate Mass) と計算精密質量 (Exact Mass)

C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> <sup>+</sup>	安息香酸 (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> )
obs. 203.1808	obs. 205.1963	obs. 123.0447
calc. 203.1794	calc. 203.1951	calc. 123.0441
C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> <sup>+</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> <sup>+</sup>
obs. 95.0860	obs. 109.1017	obs. 123.0447
calc. 95.0861	calc. 109.1018	calc. 123.1174

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- Asakawa D, Yamashita A; Kawai S, Takeuchi T; Wada Y. "N-C<sub>α</sub> Bond Cleavage of Zinc-Polyhistidine Complexes in Electron Transfer Dissociation Mediated by Zwitterion Formation. Experimental Evidence and Theoretical Analysis of the Utah-Washington Model", *J. Phys. Chem.*

- B, 120(1), 891-901 (2015) 査読有
2. Yamagaki T, Takeuchi M, Watanabe T, Sugahara K, Takeuchi T, “Mechanism for odd-electron anion generation of dihydroxybenzoic acid isomers in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with density functional theory calculations”, Rapid Comm. Mass Spectrom., 30, 2650-2654 (2016) 査読有
  3. Yoshimura S, Sugimoto S, Takeuchi T, Murai K, Kiuchi M, “Injected ion energy dependence of SiC film deposited by low-energy SiC<sub>3</sub>H<sub>9</sub><sup>+</sup> ion beam produced from hexamethyldisilane Injected ion energy dependence of SiC film deposited by low-energy SiC<sub>3</sub>H<sub>9</sub><sup>+</sup> ion beam produced from hexamethyldisilane”, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B, 420, 6-11 (2018) 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 木内正人、紅朋浩、菅井俊樹、中村義隆、藤宮仁、鈴木孝仁、竹内孝江 . 揮発性有機化合物によるカビ検出システム . 一般社団法人日本鉄鋼協会 材料の組織と特性部会 自主フォーラム「鉄鋼材料の生物劣化を誘導する影響因子の解明」第 1 回研究会, 2015.6.23 : 大阪 招待講演
2. Takae Takeuchi, Tomoko Kimura, Motoko Masuda, Sayaka Tsuru Takahito Suzuki, Yoshitaka Nakamura, Toshiki Sugai, Tomohiro Akashi, Hitoshi Fujimiya “Determination of soil-derived fungal species by ion mobility spectrometric analysis of microbial volatile organic compounds for conservation technology of cultural heritage” International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015 Congress). 2015.12.16 : ハワイ米国 招待講演
3. 塚本奈緒, 木村知子, 鈴木孝仁, 紅朋浩, 竹内孝江 . *Aspergillus nidulans* の二次代謝物の GC/MS および LC/MS/MS 分析とセスキテルペン生成関連遺伝子の探索 IV.AN3280 遺伝子 . 日本化学会第 96 春季年会 .2016.3.26 : 京田辺(京都府) ポスター発表
4. 小野 紗矢香, 山垣 亮, 竹内孝江 . イオンモビリティ質量スペクトルと理論計算によるセサミン類の構造解析 ~ 理論的アプローチ . 第 5 回イオン移動度研究会. 2016.4.16 : 東京 ポスター発表
5. 塚本奈緒, 木村知子, 鈴木孝仁, 紅朋浩, 竹内孝江 . *Aspergillus nidulans* の二次代謝物の GC/MS および LC/MS/MS 分析とセスキテルペン生成関連遺伝子の探索 V. LO8910 および LO8925 株 . 第 64 回質量分析総合討論会(2016) . 2016.5.19 : 大阪 口頭発表
6. 竹内孝江. 文化財保全環境モニター開発 — 土壌由来のカビの検出イオンモビリティマススペクトロメトリー(招待講演) . サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所シンポジウム .2016.10.17 : 相楽郡(京都) 招待講演
7. Yuri Tanaka, Tohru Yamagaki, Motoshi Sakakura, Takae Takeuchi . ”Real Time Monitoring of Microbial Volatile Metabolites of Soil-derived Fungi via Ambient Ionization Mass Spectrometry I. *P. paneum*, *F. solani*, *A. fumigatus* and *A. nidulans*” 日本化学会第 97 春季年会 . 2017.3.16 : 横浜 ポスター発表
8. 田中友理, 山垣 亮, 坂倉幹始, 竹内孝江 . 土壌由来真菌の揮発性代謝物質のリアルタイム・モニタリング II . 第 6 回イオン移動度研究会・第 157 回質量分析関西談話会合同講演会 . 2017.4.23 : 奈良 ポスター発表
9. 加太千晶, 木村知子, 紅朋浩, 竹内孝江 . セスキテルペン生成関連遺伝子 ノックアウト真菌 *Aspergillus nidulans* の揮発性代謝物質の解析 . 第 6 回イオン移動度研究会・第 157 回質量分析関西談話会合同講演会 . 2017.4.23 : 奈良 ポスター発表
10. 竹内孝江, 菅井俊樹, 中村義隆, 橋 亜友子, 青木良晃, 藤宮 仁 . 土壌由来真菌のカビ臭診断ソフトウェアの開発と大気圧イオン移動度ドリフト時間の予測 . 第 65 回質量分析総合討論会 . 2017.5.19 : つくば ポスター発表
11. 加太千晶, 木村知子, 紅朋浩, 竹内孝江 . セスキテルペン合成遺伝子変異株による *Aspergillus nidulans* の揮発性代謝物質の質量分析 □. LO8910 株, LO9253 株 . 第 20 回日本水環境学会シンポジウム . 2017.9.16 : 和歌山 ポスター発表
12. Takae Takeuchi, Yuri Tanaka, Tohru Yamagaki, Motoshi Sakakura . ”Ambient Mass Spectrometry for Monitoring Microbial Volatile Metabolites from Soil-derived Fungi Using a DART Ion Source” The 11th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '17 (ALC'17) . 2017.12.4 : 米国 ポスター発表
13. 小林優希, 木原圭史, 本山晃, 竹内孝江 . イオン移動度質量スペクトロメトリーにおけるドリフトグラムの理論的研究 II. シス/トランス異性体イオンの衝突断面積 . 日本化学会第 98 春季年会 . 2018.3.21 : 千葉 ポスター発表
14. Chiaki Kata, Tomohiro Akashi, Tomoko Kimura, Takae Takeuchi . ” Analysis of Secondary Metabolites from *Aspergillus nidulans* Using GC/MS VII. Effects of AN3275 Gene Deletion” 日本化学会第 98 春季年会 . 2018.3.21 : 千葉 ポスター発表
15. 竹内孝江, 小林優希, 木原圭史, 本山晃.

イオンモビリティ質量分析計を用いた  
シス-トランス異性体の構造と異性化反  
応機構に関する量子化学的研究：日本質  
量分析学会・日本プロテオーム学会 2018  
年合同大会(第66回質量分析総合討論会  
(2018)/日本プロテオーム学会 2018 年大  
会 /9th Asia-Oceania Human Proteome  
Organization (AOHUPO) Conference )  
2018.5.16：大阪 口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://koto10.nara-wu.ac.jp/Profiles/5/0000420/pr  
ofile.html](http://koto10.nara-wu.ac.jp/Profiles/5/0000420/profile.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

竹内 孝江 (TAKEUCHI, Takae)  
奈良女子大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：80201606

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし