

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18154

研究課題名(和文)ペリレンキノン系色素で複雑な土壤有機物の安定化機構の解明に迫る

研究課題名(英文)Studies on stabilization mechanism of soil organic matter by using perylenequinone pigments

研究代表者

小林 孝行(KOBAYASHI, Takayuki)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10551228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では複雑な土壤有機物の安定化機構の解明について、土壤ペリレンキノン(PQs)色素を用いたアプローチで試みた。本研究により以下の主要な結果を得た。

- 1) PQsの主成分がDHPQ(4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone)であることを示し、DHPQおよびDHPQ誘導体の分別定量法を開発した。
- 2) DHPQおよびDHPQ誘導体は世界中の土壤に広く分布することを明らかにした。また、火山灰土壤(黒ボク土)におけるPQ色素は腐植酸画分から安定なヒューミン画分に遷移する可能性を示した。さらに、PQ色素は活性Alとの複合体形成により長期に渡り安定に存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壤有機物(SOM)の安定化機構の解明は、地球環境の将来予測等にも繋がる学術的かつ社会的にも重要な研究課題であるが、SOMは複雑で多様な有機物の混合物であるため全容解明には至っていない。特定の有機物成分であるPQsを対象とした本研究は、SOMの多様性を軽減した研究と位置付けられる。本研究によりPQs色素の主要な化学構造の同定と定量法の確立が達成できた。さらに、DHPQは古土壤を含む世界の様々な土壤に広く分布することが明らかとなった。これは、SOM安定化機構の掌握においてPQs色素が世界中の土壤で活用可能であることを示唆しており、本研究の成果は学術的意義の高い内容であるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We attempted to elucidate the stabilization mechanism of soil organic matter using perylenequinone pigments (PQs). We could obtain the following results:

- 1) The main component of PQs is DHPQ (4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone), and we developed a quantitative method for the contents of DHPQ and DHPQ derivatives in soil.
- 2) It was revealed that DHPQ and DHPQ derivatives distribute in soils around the world. In addition, physicochemical form of PQs in buried horizon from volcanic ash soils (Andosols) may alter from in the humic acid fraction to in more stable humin fraction. Furthermore, it was suggested that PQs occur in buried soil (paleosol) for a long period of time with soil active aluminum.

研究分野：土壤学

キーワード：ペリレンキノン 土壤有機物 安定化機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸域最大の炭素プールである土壌有機物 (SOM) の安定化機構を掌握することは、地球温暖化の予測に重要な意味を持つ。しかし、SOM は様々な滞留時間を示す有機成分の混合物である。これは SOM の安定化機構の理解を困難にするだけでなく、土壌炭素の動態予測における不確実性の要因のひとつとなっている。 ^{13}C や ^{15}N 標識化合物を用いた研究や、SOM を化学的・物理的に分画した試料を用いた研究は、不確実性を軽減する上で有効である。その一方で、構造が明確かつ世界の土壌に長期間存在しうる有機物を対象とした研究も、上記問題を補完する有効なアプローチ法であるといえるが、その様な研究例はほとんど存在しない。

そこで、研究代表者らは糸状菌が生産するペリレンキノン系色素 (PQs: Perylenequinone) に着目し、有機溶媒を用いた土壌 PQs の選択的な抽出手法と PQs 含量の簡易測定法を開発した。本方にて各種土壌での PQs 含量を評価した結果、PQs は従来の通説とされていた結果と全く異なる知見を得た。すなわち、PQs は糸状菌活動が活発なポドゾルや褐色森林土よりも、黒ボク土や埋没土で高い含量であった。さらに埋没土の分析結果から、PQs は他の SOM より土壌中で高い安定性を持つという興味深い可能性も示した。以上の結果は、PQs を対象とした研究が SOM の安定化機構の解明に貢献できうることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、土壌 PQs の存在形態分析等から PQs の安定化機構を明らかにし、SOM 安定化研究における新たな知見を獲得する事を目指した。具体的には、下記内容を研究当初の目的に設定した。

(1) 土壌 PQs 色素の化学構造の解明と分析法の開発

PQs の安定化機構を理解するためには、土壌 PQs の化学構造や PQs 含量を正確に把握することが重要である。土壌 PQs は DHPQ (4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone) やその誘導体から構成される成分であることは推定されているものの、正確な化学構造は示されていない。そこで、土壌 PQs を構成する主要成分の化学構造の決定と土壌 PQs 定量法の確立を目指す。

(2) 土壌 PQs の存在形態の解明

土壌有機物は酸やアルカリに対する溶解性に応じて、操作的に腐植酸 (酸不溶でアルカリ可溶)、フルボ酸 (酸にもアルカリにも可溶)、ヒューミン (酸にもアルカリにも不溶) に区分される。本実験では我が国の黒ボク土および褐色森林土における PQs の上記 3 画分への分布割合を明らかにする。

(3) タイプ別土壌の PQs 安定性と存在形態の関係検討

種々の土壌を用いた埋設試験によって PQs の存在形態がどの様に遷移するかを評価することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 土壌 PQs 色素の化学構造の解明と分析法の開発

PQs を多く含むことが分かっている妙高山 (新潟県) の非アロフェン質黒ボク土の埋没層を使用した。風乾細土 (約 5 kg) に HCl-DMSO (ジメチルスルホキシド) 混液を加え、土壌から PQs を抽出した。抽出液 (約 15L) の pH を 10 M NaOH で 10 程度に調整後、冷暗所にて一晩静置し、PQs が分布する上澄液を遠心分離にて回収した。酸性化した抽出液に存在する PQs をクロロホルムで抽出した。クロロホルム抽出液を 0.1 M アンモニア水 (pH10) および 0.1M NaOH 水溶液 (pH13) にて逐次で液液抽出を行なった。アンモニア水抽出画分 (C1 画分)、および NaOH 水溶液抽出画分 (C2 画分) を酸性化後、クロロホルムで PQs を抽出した。クロロホルム抽出液を減圧乾固後、乾固物を各種溶媒で洗浄した。洗浄物の ^{13}C , ^1H -NMR スペクトルを重硫酸を溶媒として測定した。また、DART-MS 分析にて質量分析も行なった。その他、UV-Vis スペクトル、IR スペクトルおよびモル吸光係数 (1%吸光係数) も測定した。両画分に加え、PQs の発色団母核と考えられている DHPQ についても同様の分析に供した (DHPQ は有機合成により調製した)。

(2) 土壌 PQs の存在形態の解明

アロフェン質黒ボク土 (A 層と埋没層)、非アロフェン質黒ボク土 (A 層)、褐色森林土 (A 層)、をアルカリ抽出にて腐植抽出液を調製後、これを酸性にすることで腐植酸画分とフルボ酸画分を分離した。両画分の水溶性および脂溶性の PQs 含量を評価した。また、アルカリ抽出後の残土 (ヒューミン) における水溶性および脂溶性 PQs 含量を測定した。水溶性 PQs 含量は Sato (1974) の方法を用いた。以上の結果より、腐植酸、フルボ酸、ヒューミン画分への PQs の分布割合を検討した。

(3) タイプ別土壌の PQs 安定性と存在形態の関係検討

当初は埋設試験により、様々な土壌での PQs 含量と存在形態を評価する予定であった。しかし予備検討の結果、研究期間内での評価が困難であると判断された。そこで、国内外の様々な表層土壌および累積性火山灰土壌断面における PQs の分布とその存在形態を評価することにした。

4. 研究成果

(1) 土壌 PQs 色素の化学構造の解明と分析法の開発

アンモニア水抽出画分 (C1 画分) と NaOH 抽出画分 (C2 画分) は、濃硫酸やトリクロロ酢酸、フェノール以外の溶媒に対する溶解性が極めて低く、クロロホルムや 0.1M NaOH にわずかなが

ら溶解する程度であった。この傾向は有機合成で得られた DHPQ も同じであった。両画分ならびに DHPQ の UV-Vis スペクトルを図 1 に示した。濃硫酸下における C2 画分と DHPQ のスペクトルはほぼ一致することがわかる。¹H, ¹³C-NMR スペクトルおよび DART-MS スペクトルにおいても、C2 画分と DHPQ のスペクトルはほぼ一致した。以上より、C2 画分は DHPQ と結論づけられた。一方、クロロホルム溶液における C1 画分のスペクトルは赤色移動している点を除くと、C2 画分のスペクトル形状と類似していた (図 1)。さらに NMR および DART-MS スペクトルの結果より、C1 画分は水酸基やカルボキシル基が 1 つあるいは 1 つずつ DHPQ に結合した DHPQ 誘導体の混合物であることが明らかとなった。図 2 に本研究で明らかとなった土壤 PQs の化学構造を示す。

以上の結果に基づき、クロロホルムにおける DHPQ のモル吸光係数と C1 画分の 1% 吸光係数を決定した。また、分画前の UV-Vis スペクトルのベースラインを補正後、C1 画分 (DHPQ 誘導体) と C2 画分 (DHPQ) のスペクトルに分解することで、両画分の含量を分別定量する手法を確立した。

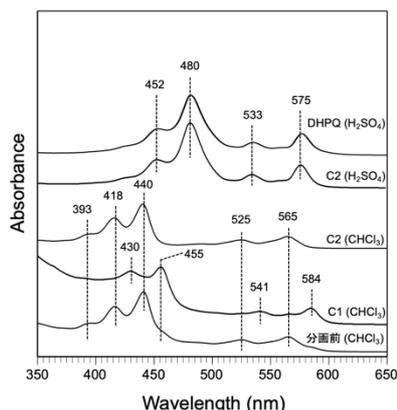


図1. DHPQと各画分のUV-Visスペクトル (括弧内は測定に用いた溶媒を示す)

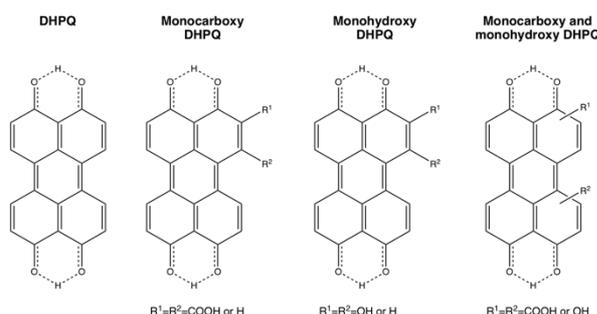


図2. 本研究で明らかとなった土壤PQsの構造 (DHPQ: 4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone)

(2) 土壤 PQs の存在形態の解明

図 3 に各土壤における PQs の分布割合を示す。いずれの土壤でも PQs は腐植酸画分に 60~80% 分布することから、PQs の多くは腐植酸画分に存在することが明らかとなった。ヒューミン画分には 20~40% 程度の PQs が分布し、フルボ酸画分にはほとんど分布しなかった。藤沢土壤の表層と埋没層 (富士黒土層:6000~8000 年前) の結果を比較すると、ヒューミン画分に分布する PQs の割合は埋没層の方が表層より高かった。ヒューミン画分は腐植酸画分より安定 (微生物による分解や流亡などを受けにくい) な有機物と考えられることから、埋没層の PQs の一部は 6000~8000 年の間に、腐植酸画分の PQs は安定なヒューミン画分に遷移するか、もしくは消失した可能性が示唆された。

図 4 に全結果をまとめたものを示した。水溶性の PQs は全 PQs の 55% (=48%+7%) を占め、残りの 45% が脂溶性 PQs であることがわかった。また、ヒューミン画分の PQs は腐植酸画分と比べて脂溶性 PQs の割合が大きかった。PQs の溶解性は PQs 自体の化学構造に起因する溶解性だけでなく、共存する粘土鉱物や活性 Al や Fe によって変化する可能性がある。これらについて明らかにすることは今後の課題であるが、今回使用した土壤は主に火山灰土壤であることから、PQs は活性 Al と有機-無機複合体を形成して長期 (最低でも 6000~8000 年間) に渡って安定に存在しうるものと考えられた。

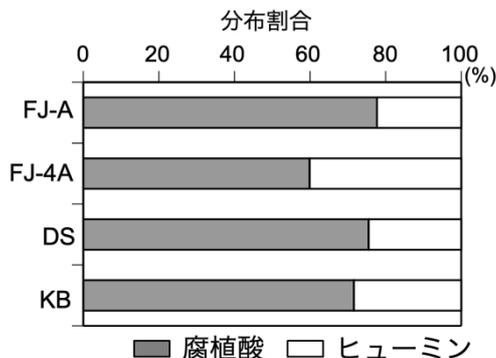


図3. PQsの分布割合 (FJ:藤沢土壤 (アロフェン質黒ボク土), DS:大山土壤 (非アロフェン質黒ボク土), KB:神戸土壤 (普通褐色森林土))

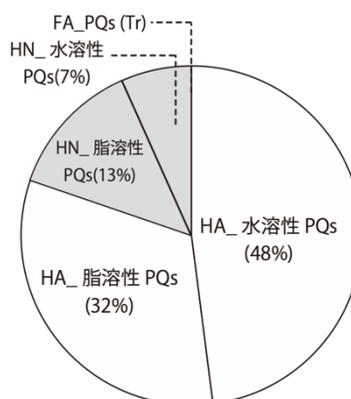


図4. 各画分へのPQsの分布割合 (Tr: Trace) (HA: 腐植酸、HN: ヒューミン、FA: フルボ酸)

(3) 各種土壌における PQs の分布

国内外 40 地点の表層土壌の PQs 含量を測定した結果、39 地点で DHPQ および DHPQ 誘導体が検出された。PQs が検出されなかった 1 地点は Aridisols に分類される土壌 (米国アリゾナ州) であり、水分および土壌微生物活性が極めて乏しいために、PQs が非検出であったと考えられた。その他の地点では DHPQ は 0.3~26 (mg/kg) 検出され、特に我が国の黒ボク土とポドゾルおよび米国のポドゾルで高かった。DHPQ 誘導体は 0.1~60 (mg/kg) であった。DHPQ と DHPQ 誘導体の合計量に占める DHPQ の割合は 26~100% と幅広い値を示したが、多くの土壌で DHPQ が 50% 以上を占めていた。これより DHPQ は PQs の主要成分と考えられた。また、PQs の生産者のひとつとして考えられている糸状菌 (*Cenococcum Geophilum*) の菌核における DHPQ、および DHPQ 誘導体含量はそれぞれ 335 mg/kg, 830 mg/kg と土壌と比べて極めて高かったことより、菌核は PQs の主要な生産者であると考えられた。しかしながら、PQs 含量の高かった日本の黒ボク土では、菌核の存在を確認できなかった。したがって、菌核以外にも PQs 生産菌が存在するものと考えられた。

鹿児島県志布志市における累積性火山灰土壌を対象に、PQs の垂直分布を 10cm ごとに深さ 240cm まで評価した。この土壌断面には約 7300 年前に噴出したとされる鬼界アカホヤ火山灰 (K-Ah) を含んでいる。分析の結果、DHPQ およびその誘導体は全試料で検出された。また、表層よりも約 4000 年前 (ヒューミン画分の ¹⁴C 年代) の埋没層に相当する層位で最も DHPQ 含量が高かった。さらに K-Ah 直下の埋没層でも現表層より高い DHPQ 含量であった。以上より、DHPQ は長期に渡って安定する成分であると考えられた。また、DHPQ 含量の垂直分布はピロリン酸可溶の Al 含量と正の相関関係を示したことより、DHPQ はピロリン酸可溶性の活性 Al と複合体を形成することで長期間安定に存在する可能性が示唆された。これは (2) の結果を支持するものである。

(4) まとめ

本研究では複雑な土壌有機物の安定化機構の解明について、土壌ペリレンキノン (PQ) 色素を用いたアプローチにて試みた結果、以下の主要な結果を得た。

- 1) PQ 色素の主成分が DHPQ (4,9-dihydroxypelyrene-3,10-quinone) であることを示した。同時に数種の DHPQ 誘導体の存在も明らかにし、DHPQ および DHPQ 誘導体の定量法を開発した。
- 2) DHPQ および DHPQ 誘導体は世界中の土壌に広く分布することを明らかにした。また、火山灰土壌 (黒ボク土) における PQ 色素は腐植酸画分から安定なヒューミン画分に遷移する可能性を示した。さらに、PQ 色素は Al や Fe との複合体形成により長期間安定に土壌中で存在する可能性が考えられた。

近年、SOM の安定性には植物炭化物などのブラックカーボン (BC) 中の縮合芳香族炭素の関与が指摘されている。DHPQ をはじめとする PQs は低次であるがその骨格は縮合芳香族構造を持つ。そのため今後は、PQs の安定性に関与する活性 Al や Fe の形態についての検討に加え、生物起源の縮合芳香族炭素としての PQs の寄与について検討を行う必要がある。

<引用文献>

Sato O 1974: Methods for estimating Pg content in P type humic acid and for calculating $\Delta \log K$ of its Pb fraction. Soil Sci. Plant Nutr., 20, 343-351.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Takayuki、Rasmussen Craig、Sumida Hiroaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Characterization of the perylenequinone pigments in Japanese Andosols and Cambisol	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1080/00380768.2018.1536846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林孝行、Dhakal Prakash、Rasmussen Craig、隅田裕明
2. 発表標題 日本および米国土壌におけるペリレンキノン色素の分布特性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林孝行、Prakash Dhakal、Craig Rasmussen、隅田裕明
2. 発表標題 米国土壌におけるペリレンキノン系色素の分布特性
3. 学会等名 日本ペドロロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林孝行、袴田航、隅田裕明
2. 発表標題 土壌中のペリレンキノン系緑色色素の分離精製とその化学構造特性
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林孝行、隅田裕明
2. 発表標題 富士黒土層を含む累積性黒ボク土断面におけるペリレンキノン系色素の分布特性
3. 学会等名 第四紀学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩下真理、小林孝行、井上弦、隅田裕明
2. 発表標題 南九州累積性火山灰土壌の一般理化学性とその土壌分類
3. 学会等名 日本ペドロロジー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林孝行、伊藤信靖、袴田航、隅田裕明
2. 発表標題 土壌中のペリレンキノン緑色色素の構造解析
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----