

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871185

研究課題名(和文) 土壌菌核が高濃度に含有するキノンの役割解明

研究課題名(英文) Role elucidation of quinones contained in sclerotia grains of *Cenococcum geophilum*

研究代表者

伊藤 信靖 (ITO, Nobuyasu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：70415644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、菌根菌の一種である *Cenococcum geophilum* が、休眠体中に高濃度で含んでいる 4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone (DHPQ) の役割を明らかにすることを目的とし、“構造強化材の機能”、“電子伝達媒体の機能”、および“抗菌材の機能”について検証した。その結果、DHPQには錯形成能や抗菌能が認められなかった。その一方で、DHPQと菌核粒子には共通して強いラジカル活性が認められた。これらのことから、DHPQは電子伝達媒体、あるいはラジカル暴露から生体を防御する役割、を担っているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)： *Cenococcum geophilum* (Cg) is a type of rhizobia and sclerotium grains are resting bodies of Cg found over the world. Sclerotium grains contain a remarkable amount of 4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone (DHPQ), however, its role is still unclear. In this study, I examined the role of DHPQ in sclerotium grains such as "material to keep its structure", "material for electron transfer" and "material for antibiotic property". From the results, DHPQ should play important role for media of electron transfer, defense from radical stresses from outside, or both.

研究分野：環境化学

キーワード：ペリレンキノン 菌核粒子 *Cenococcum geophilum* 役割

1. 研究開始当初の背景

Cenococcum geophilum (*C. geophilum*) は、植物の根と共生関係にある菌根菌の一種である。この菌の特徴としては、土壌菌核粒子と呼ばれる休眠体 (直径 1~2 mm 程度の黒色粒子) を土壌中に形成することが挙げられる。この菌核粒子は世界中の森林土壌から広く見つかっているが、その生態や生活環については未だ不明な部分が多い。

菌核粒子は、非晶質の酸化アルミニウムによる堅いハニカム構造 (細孔の大きさは 5~20 μm) を骨格とし、黒色色素である 4,9-ジヒドロキシペリレン-3,10-キノン (DHPQ) を重量比で数%含んでいる。一般的な菌は胞子を形成し、胞子の外側の堅い壁によって外界からの刺激や環境の変化から身を守り、種を存続させる。ところが、*C. geophilum* は胞子を形成しない。このため *C. geophilum* にとっては、菌核粒子が外的な刺激や環境要因の変化から身を守り、種を存続する上での重要な形態であるものと推察される。このような背景から、菌核粒子に高濃度で含まれる DHPQ は、*C. geophilum* が種を存続させる上での大きな役割を担っていると予想されるものの、その機能については知見が全くなかった。

2. 研究の目的

本申請課題では、DHPQ の化学構造から推察される性質と菌核粒子の形態を維持する上で重要となる 3 つの機能、“構造強化材としての機能”、“電子伝達媒体としての機能”、および“抗菌材としての機能”に対して検証を行い、菌核粒子中での役割を明らかにすることを目的とした。また、これらの検証と並行して実際の菌核粒子についても同様の検証を行う。これらを遂行することによって結果を総合的に解析し、菌核粒子中に高濃度で含まれている DHPQ の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試薬等

試薬として購入できない DHPQ については、既報に従って合成した。それ以外の構造類似化合物等については、試薬を購入してそのまま用いた。比較や検討に用いた化合物の化学構造式を図に示した。

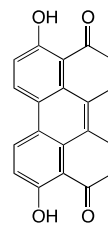
(2) DHPQ の合成と純度評価

DHPQ は、既報 (A. Calderbank et al., J. Chem Soc., 1954: 1285-1289) に従って合成した。既報の合成方法では 1 ロット毎に得られる収量が少ないため、複数回にわたって合成を行い、それらを合わせて用いた。また、得られた DHPQ の純度評価は有機元素分析計により行った。

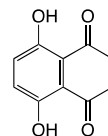
(3) 酸解離定数 (pKa) の評価

0.1 M NaOH 水溶液に溶解した DHPQ および比較評価用の 5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフト

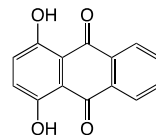
キノン (DHNQ)、1,4-ジヒドロキシアントラキノン (DHAQ)、テトラサイクリンについて、中和滴定法を行って酸解離定数 (pKa) を算出した。



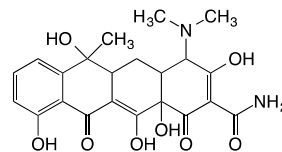
4,9-ジヒドロキシペリレン-3,10-キノン (DHPQ)



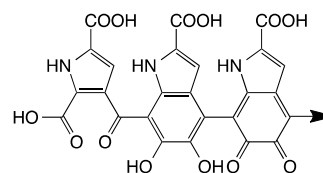
5,8-ジヒドロキシ-1,4-ナフトキノン (DHNQ)



1,4-ジヒドロキシアントラキノン (DHAQ)



テトラサイクリン



メラニン

図 本研究で検討した化合物の化学構造

(4) Al³⁺との錯形成能の評価

当初は、DHPQ や DHNQ、DHAQ、テトラサイクリンについて、水溶液中での錯形成能 (3 倍量程度の Al³⁺まで) の評価を滴定 (吸光スペクトルの変化を測定) により行った。しかしながら水溶液中では、明らかな錯形成は認められなかった。このため、DHPQ を有機溶媒 (1,4-ジオキサソラン) に溶解した上で、Al³⁺ を 500 倍量まで段階的に増やし、吸光スペクトルの変化から錯形成能を評価した。

(5) 抗菌能の評価

抗菌能の評価は、最小発育阻止濃度 (MIC) により行った。菌種には大腸菌 (*Escherichia coli*) と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を用いた。DHPQ の抗菌能を比較評価するため、テトラサイクリン (抗菌剤)、DHNQ、DHAQ、メラニンについても MIC を行った。

(6) 隔壁内部における炭素量分布の評価

予め洗浄した菌核粒子をエポキシ系樹脂に包埋した後に、ウルトラミクロトームで薄切片を作成した。この薄切片について、透過型電子顕微鏡 (TEM) とエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) を用いて隔壁内部における炭素や他元素の存在比や局所分布を評価した。

(7) 電子伝達能の評価

当初は、ジメチルスルホキシド中でのサイクリックボルタモグラムの評価を試みたが、良好な結果が得られなかった。このため、電子スピン共鳴 (ESR) 装置を用いて個々の試薬や菌核粒子についてフリーラジカル活性としての評価を行なった。

4. 研究成果

(1) DHPQ の合成と純度評価

既報に従って DHPQ を複数回合成したことにより、合計で約 3g の粗 DHPQ を得た。この粗 DHPQ の純度について評価した結果、80%以上の純度であることが確認できた。この時点で得られた DHPQ の量と純度は、以降の DHPQ の機能検証を行う上で十分であると判断し、更なる精製操作等については行わないこととした。

(2) 酸解離定数 (pKa) の評価

滴定結果を一価解離モデルと二価解離モデルで解析し、滴定結果と解析モデルの結果がより一致しているモデルを用いて、酸解離定数を算出した。その結果、いずれの化合物も二価解離モデルと良く一致しており、 pK_{a1} は DHPQ が 10.5、DHNQ が 8.7、DHAQ が 9.7、テトラサイクリンが 8.7 であった。また、これらのいずれの化合物についても pK_{a2} は 20 以上であった。類似した構造の中でも DHPQ の pK_{a1} が最も高かったことから、DHPQ の水に対する不溶性の一因が高い pK_{a1} 値にあるとともに、通常的环境下における pH では、ほとんど解離していないことが明らかになった。

(3) Al^{3+} との錯形成能の評価

当初は水溶液中で DHPQ と Al^{3+} との錯形成能について評価を行なったが、3 倍量程度の Al^{3+} を添加した場合であっても、DHPQ の錯形成は確認できなかった。このため、1,4-ジオキサニに DHPQ を溶解し、DHPQ に対して 500 倍量まで Al^{3+} を共存させて錯形成を観察した。その結果、2 倍量程度でも若干のスペクトル変化は認められたものの、100 倍量の Al^{3+} が存在する時とは吸光スペクトルが明らかに異なっていた。DHNQ、DHAQ、テトラサイクリンについても同様に検討してみたものの、DHPQ とほぼ同様の結果が得られた。これらのことから、DHPQ 及び類似構造化合物は、 Al^{3+} と積極的に錯形成をしないことが明らかになった。

さらに、強制的に Al^{3+} と錯形成させた DHPQ

(DHPQ- Al) を合成し、DHPQ や粉碎した菌核粒子をフーリエ変換赤外吸収分光装置 (FT-IR) により測定した。その結果、菌核粒子には、DHPQ- Al に特徴的なピーク (1510 cm^{-1}) が観察されなかった。このことから、菌核粒子に含まれている DHPQ は錯形成をしておらず、DHPQ そのものとして存在しているものと考えられた。

(4) 抗菌能の評価

MIC の結果は、表の通りであった。DHNQ には若干の抗菌能が認められたものの、DHPQ とともに菌核粒子に含まれているメラニンについても、抗菌性は認められなかった。これらのことから、DHPQ はメラニンとともに、抗菌剤としての役割を持たないものと考えられた。

表 DHPQ と類似化合物の MIC 結果

	E. coli	S. aureus
DHPQ	>512 $\mu\text{g/mL}$	>512 $\mu\text{g/mL}$
DHAQ	>512 $\mu\text{g/mL}$	>512 $\mu\text{g/mL}$
DHNQ	64 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$
テトラサイクリン	2 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
メラニン	>512 $\mu\text{g/mL}$	>512 $\mu\text{g/mL}$

>512 $\mu\text{g/mL}$ は、最大濃度 (512 $\mu\text{g/mL}$) でも菌の発育が阻止されなかったことを示す

(5) 隔壁内部における炭素量の局所分布

菌核粒子の複数箇所を隔壁内部における元素組成と成分分布を測定した。その結果、構成元素のほとんどが炭素 (C) であり、アルミニウム (Al) や酸素 (O) は非常に少なかった。今回の結果からは、高い炭素成分の由来となっている化合物の同定までには至らなかったものの、低い酸素含量に加えて窒素が検出されなかったことから、DHPQ やメラニンに由来するものと推察され、これらは隔壁内部で一様に分布していることがわかった。

(6) 電子伝達能の評価

DHPQ の電子伝達能については当初、ジメチルスルホキシド中でのサイクリックボルタモグラムの評価を検討した。その結果、試薬中に含まれる不純物や溶存二酸化炭素による影響が抑えられていないことが明らかになった。このことから、溶液中での評価を断念し、ESR 装置を用いたラジカル活性による評価を行うこととした。

DHPQ やこれまでも比較検討を行ってきた DHNQ、DHAQ、テトラサイクリンに加えて、DHPQ に Al^{3+} や Fe^{3+} を錯形成させた化合物 (それぞれ DHPQ- Al , DHPQ- Fe)、菌核粒子自体についても ESR によるラジカル活性評価を行った。その結果、DHPQ とメラニンの両者にはラジカル活性が認められ、DHPQ の方が強い活性を示した。また、菌核粒子自体にもラジカル

活性が認められた。その一方で、DHNQ、DHAQ、テトラサイクリン、DHPQ-AI 及び DHPQ-Fe については、ラジカル活性が認められなかった。これらのことから、菌核粒子のラジカル活性は DHPQ やメラニンに由来するとともに、菌核粒子内では Al^{3+} 及び Fe^{3+} と錯形成していない、あるいは DHPQ-AI や DHPQ-Fe の形態で存在していても、存在量としては少ないものと考えられた。

以上のことから、DHPQ は菌核粒子の基本骨格を形成する Al^{3+} と錯形成を行わず、また、メラニンとともに抗菌性が認められなかった。その一方で、DHPQ とメラニン、菌核粒子に共通して強いラジカル活性が認められた。これらの結果を総合的に考察すると、DHPQ は菌核粒子中で電子伝達系としての役割、あるいは環境中でのラジカル暴露から生体を防御する役割を主に果たしているものと考えられた。また、これらの役割を長期にわたって効果的に果たすためには、DHPQ とメラニンの共通した水への不溶性(DHPQ については高い pKa 値) と高い耐光性が、重要な性質であるものと考えられた。

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1件)

伊藤信靖、橋本文寿、坂上伸生、渡邊真紀子、The structure of a perylene-containing fossilized sclerotium is maintained by original silica, *Organic Geochemistry*、査読有、Vol. 63、2013、pp. 37-39、DOI: 10.1016/j.orggeochem.2013.08.005

〔学会発表〕(計3件)

伊藤信靖、坂上伸生、渡邊真紀子、Antimicrobial Activity of 4,9-Dihydroxyperylene-3,10-Quinone Contained in *Cenococcum Geophilum*、Goldschmidt conference 2015、2015.8、プラハ(チェコ共和国)

伊藤信靖、坂上伸生、渡邊真紀子、菌根菌の *Cenococcum geophilum* が高濃度に含む 4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone の抗菌性、第24回環境化学討論会、2015年6月、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌)

伊藤信靖、坂上伸生、鳥村政基、渡邊真紀子、琵琶湖堆積物中のペリレン含有断片の特徴、第22回環境化学討論会、2013年07月、東京農工大学(東京都・府中市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 信靖 (ITO, Nobuyasu)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・物質計測標準研究部門・主任研究員
研究者番号：70415644

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡邊真紀子 (WATANABE, Makiko)
首都大学東京・都市環境科学研究科・教授
研究者番号：10175119
坂上伸生 (SAKAGAMI, Nobuo)
茨城大学・農学部・助教
研究者番号：00564709