

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710031

研究課題名（和文） 堆積物中ペリレンの新規指標物質としての確立と検証

研究課題名（英文） Development of fossil perylene as a new indicator for reconstruction of past environment

研究代表者

伊藤 信靖（NOBUYASU ITOH）

独立行政法人産業技術総合研究所 計測標準研究部門・研究員

研究者番号：70415644

研究成果の概要（和文）：ペリレンは5つのベンゼン環により構成された多環芳香族炭化水素類の一種であり、世界中の堆積物から検出される。しかしながら、その起源が不明であったために指標物質として利用できなかった。そこで高濃度にペリレンを含む琵琶湖を研究対象とし、複数の顕微鏡による形態観察と化学分析によりその起源を検証した。その結果、菌根菌である *Cenococcum geophilum* の休眠体（菌核粒子）に含まれる色素が、ペリレンの主な起源であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Perylene composed from five benzene rings is commonly found in sediments throughout the world. However, there are no direct evidences of perylene origin. To identify origin of fossil perylene in sediments, we examined the relationship between sedimentary perylene and sclerotium grains of *Cenococcum geophilum* (*Cg*) in a catchment area at Lake Biwa. From the results of microscopes and chemical analyses, it can be concluded that fossil perylene in the Lake Biwa sediment originates mainly from the pigment contained in sclerotium grains of *Cg* in its catchment area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：環境変動、古環境、環境分析、機器分析

1. 研究開始当初の背景

近未来的な環境変動を予測する上では、過去の環境変動やそれに対する生態系の応答を正確に把握することが不可欠である。水環境における堆積物は、過去の環境変動を解析する上での記録媒体として非常に有用であり、これまでも物理的・化学的・生物的な指標を用いた環境変動の解析に対する研究が広く行われてきた。その一方で、一つの指標物質からだけでは環境変動に対する解析が難しく、複数の指標物質から総合的に解析

することが必要である。このため、これまで指標物質として利用できなかった化学物質を新たな指標物質として確立することにより、過去の環境変動を解析する上での精度向上が可能となる。

多環芳香族炭化水素類の一種であるペリレンは、数十年以上前から既に堆積物中から検出されており、世界中の堆積物からほぼ普遍的に検出されていることも明らかになっている（M. I. Venkatesan, *Mar. Chem.* 25: 1-27, 1988）。また、ペリレンは化学構造中

に官能基を持たず、共役二重結合のみから形成されているため、堆積物中で安定に存在することが可能であり、2億年前の堆積層からも検出されている (C. Jiang et al., *Org. Geochem.* 31: 1545-1559, 2000)。しかしながら、その起源が不明であったため、燃焼を主たる起源とする他の多環芳香族炭化水素類とは異なり、指標物質として利用できなかった。

これまでもペリレンの起源を明らかにする研究は国内外で行われてきており、親化合物として菌類や昆虫類由来の 4,9-ジヒドロキシ-3,10-ペリレンキノン (DHPQ) が有力視されている (C. Jiang et al., *Org. Geochem.* 31: 1545-1559, 2000) もの、DHPQ からペリレンへと変化するのに長い時間がかかる (100 年程度 : P.M. Gschwend et al., *Geochim. Cosmochim. Acta* 47: 2115-2119, 1983) ことから、未だ達成できていなかった。近年になり、古い堆積層に埋没していた樹木から高濃度のペリレンが検出される (Bechtel et al., *Org. Geochem.* 38: 1850-1864, 2007; Jiang and Liu, *Org. Geochem.* 39: 1462-1465, 2008) とともに、堆積物柱状試料中のペリレン量と菌類由来の孢子量との間に正の相関が認められたとの報告がある (Grice et al., *Geochim. Cosmochim. Acta* 73: 6531-6543, 2009)。このことから、堆積物中のペリレンが菌類と関係しているとの仮説は支持されているものの、両者を直接的に結びつける実験的な証拠は、未だに得られていない。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、琵琶湖の堆積物中には高濃度のペリレンが含まれており ($2.1 \mu\text{g g}^{-1}$)、有機炭素量比では世界的にも類を見ないほど高濃度である ($\sim 200 \mu\text{g g-carbon}^{-1}$) ことを明らかにした (N. Itoh et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 2039-2049, 2009)。また、琵琶湖水の沈降粒子中ではペリレンの濃度がそれほど高くない ($0.2 \mu\text{g g}^{-1}$) ことを明らかにする (N. Itoh et al., *Limnology* 11: 241-250, 2010) とともに、ペリレンの炭素安定同位体比から陸起源、特に裸子植物と深い関係があることを明らかにした (N. Itoh and N. Hanari, *Geochem. J.* 44: 161-166, 2010)。さらに、堆積物柱状試料中のペリレン分布から、洪水があった時期にペリレンの濃度が一過性に上昇することも明らかにした (N. Itoh et al., *Org. Geochem.* 41: 845-852, 2010)。その一方で、ペリレンの起源を特定するには未だ至っていない。

研究代表者は、これまでの自身の研究成果による陸起源であるとの知見に加え、土壌に含まれる菌核粒子 (*Cenococcum geophilum* の休眠体) に DHPQ が高濃度で含まれること

(T. Sato, *Soil Sci. Plant Nutr.* 22: 269-275, 1976)、およびこの菌核粒子は世界中で広く見つかっていること (N. Sakagami, *Geogr. Rev. Jpn* 82: 184-195, 2010) から、菌核粒子の遺骸に含まれる DHPQ が堆積物中に存在するペリレンの主たる起源であるものと推察した。事実、非晶質の酸化アルミニウム構造 (菌核粒子の主成分) を分解することが可能な抽出法を琵琶湖堆積物に適用したところ、ペリレンの抽出量は大幅に増加した (研究代表者の未発表データ)。

そこで本研究では、菌根菌の一種である *Cenococcum geophilum* (*Cg*) に着目し、堆積物中に含まれるペリレンを指標物質として確立・検証することを目的とした。この目的を達成するため、以下の3点について研究を推進した。

1. 蛍光顕微鏡を用いた堆積物における菌核粒子断片の探索と採集
2. 堆積物から採取した菌核粒子断片の同定
3. ペリレンの長期保存性に関する検証

3. 研究の方法

(1) 琵琶湖

本研究課題では、検証地点に琵琶湖を選定した。琵琶湖の堆積物には世界的にも高濃度のペリレンが含まれているとともに、ペリレンの水平・鉛直分布等に関する知見も多いため、ペリレンの起源について検証する地点としては最適である。

(2) 土壌中からの菌核粒子の採集

琵琶湖集水域における *Cg* の菌核粒子は、琵琶湖に流入する最大河川の一つ、姉川の源流に位置する金糞岳 ($35^{\circ}32' 14'' \text{N}$, $136^{\circ}20' 36'' \text{E}$, 図1) から褐色森林土を採取し、その土壌中から目視で検出した。

(3) 堆積物中の菌核粒子やその断片の採集

検証用の堆積物試料には、琵琶湖堆積物から調製された組成標準物質 (NMIJ CRM7307-a) を用いた。この標準物質 (乾燥試料) 1 g を Milli-Q 水に懸濁し、超音波により洗浄した後、上清を

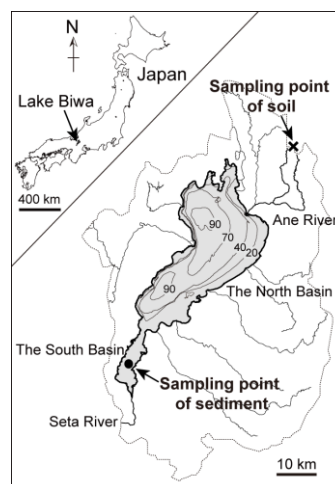


図1 試料採取地点

目開き 40 μm のナイロンメッシュでろ過した。ナイロンメッシュ上に捕集された粒子を再度 Milli-Q 水に懸濁して超音波洗浄した後、再び 40 μm のナイロンメッシュ上に捕集した。メッシュ上に捕集された粒子は、実体顕微鏡下で観察するとともに、紫外光下で個別に採取した。それぞれの粒子をカーボンテープ上に固着し、分光器を備えた蛍光顕微鏡およびエネルギー分散型 X 線分光器を備えた走査型電子顕微鏡 (SEM/EDX) により観察した。

(4) 堆積物中の菌核粒子断片の結晶性確認
ペリレンを高濃度に含有する菌核粒子断片の結晶性については、微小 X 線結晶回折装置を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 集水域土壌からの菌核粒子の採集

サンプリングを行った金糞岳の褐色森林土からは、複数個の光沢を持つ黒色球体が見つかった (>1 mm- ϕ のものが 1 kg あたり 40 個程度)。その外観と、SEM を用いた断面観察 (特徴的な細胞壁構造と隔壁孔) および EDX による元素分析の結果 (数%の Al) から、これらの黒色球体は *Cg* の菌核粒子であると特定された (図 2)。

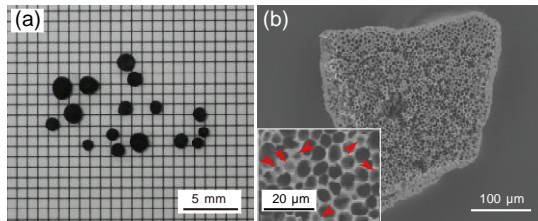


図 2 集水域から採集された菌核粒子の肉眼像 (a) と走査型電子顕微鏡像 (b)。矢印は隔壁孔を示す。

(2) 堆積物からの菌核粒子の採集

琵琶湖堆積物を用いた実験では、ナイロンメッシュ上に様々な色や形態の粒子が捕集された。その中には黒色の球体粒子が多く存在し、この黒色球体粒子を SEM により断面観察したところ、*Cg* の菌核粒子に特徴的な細胞壁構造と隔壁孔を持つことが確認できた (図 3)。このことから、この黒色球体粒子は *Cg* の菌核粒子であると結論付けた。

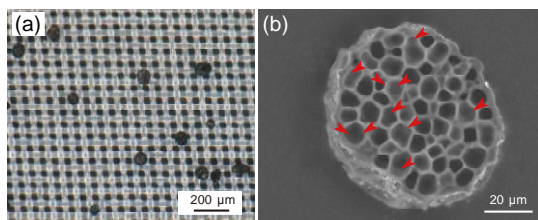


図 3 堆積物から採集された菌核粒子のマイクロスコープ像 (a) と走査型電子顕微鏡像 (b)。矢印は隔壁孔を示す。

今回検証に用いた琵琶湖堆積物は、姉川が流入する北湖盆と唯一の流出河川である淀川との間に位置する南湖盆から採取・調製されたものである (図 1)。このことから、集水域に生息する *Cg* の菌核粒子が琵琶湖に流入し、湖内全体に広く分布していることが強く示唆された。

(3) 堆積物からのペリレン含有粒子の採集

メッシュ上には様々な粒子 (鉱物や花粉など) が存在するため、ペリレンが紫外光下で青色の蛍光を発する特性を利用し、青色に蛍光発色する粒子を個別に採集した。

採集した粒子のほとんどは白色光下では乳白色であり、球体ではなかった。これらの粒子を分光器が接続された蛍光顕微鏡により観察した結果、*Cg* の菌核粒子に特徴的な細孔構造が認められる (図 4) とともに、ペリレンを含むことも確認できた。

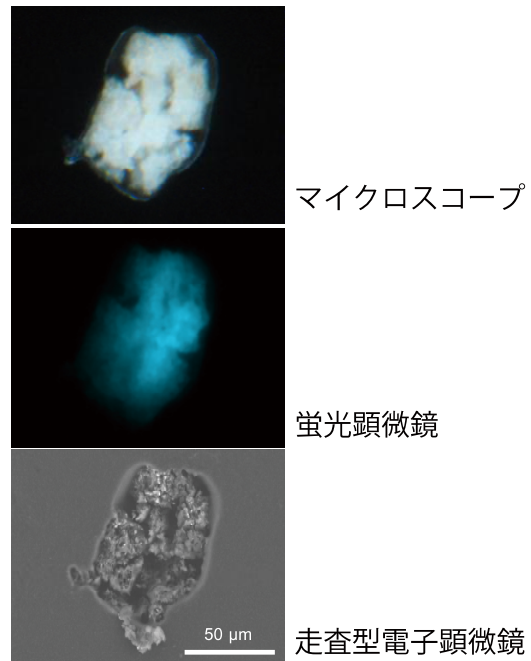


図 4 堆積物から採集された菌核粒子断片像。ペリレンの存在量から、続成過程の最終段階と判断された。

(4) ペリレン生成経路の検証

採集した粒子はそれぞれ、少しずつ蛍光スペクトルが異なっていた。このため、複数個の蛍光粒子について蛍光スペクトルを採集した。また、DHPQ および 3, 10-ペリレンキノン (3, 10-PQ) を別途合成し、これらの化合物についても蛍光スペクトルを観測した。蛍光粒子の蛍光スペクトルを、ペリレン、DHPQ および 3, 10-PQ の蛍光スペクトルと比較して相対量の推定を行った。その結果、*Cg* の菌核粒子に含まれる DHPQ は 3, 10-PQ を経由してペリレンになることが示唆された (図 5)。

*Cg*は菌核粒子だけではなく、菌糸にも DHPQ を含んでいること (K. Nakabayashi et al., *Soil Sci. Plant Nutir.* 37: 93-99, 1991) や、*Cg*由来の DHPQ が腐植物質中にも多く含まれている (K. Kumada and H.M. Hurst, *Nature* 214: 631-633, 1967) との報告もある。これらのことから、琵琶湖堆積物に含まれる高濃度ペリレンの起源は、集水域に生息する *Cg*に由来するものと考えられた。

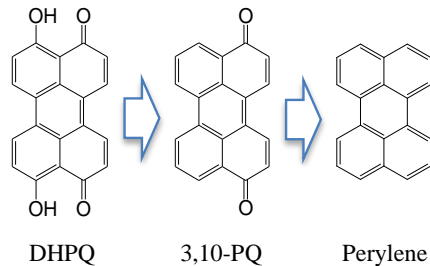


図5 DHPQからペリレンへの生成経路

(5) ペリレン含有粒子の元素組成

ペリレンを高濃度に含む菌核粒子断片についてSEM/EDXにより元素分析をしたところ、菌核粒子に特徴的なアルミニウム (Al) はほとんど検出されず、炭素 (C)、酸素 (O)、およびけい素 (Si) のみで構成されていた (図 6b)。新鮮な菌核粒子は、非晶質の酸化アルミニウムにより構造を維持しているものと考えられている。このことから、これらの断片がどのようにして堆積物中で長期間に渡り形状を維持しているのかについては不明である。しかしながら、どの菌核粒子断片にも共通してけい素が含まれていたことに着目し、残存するけい素が形状の維持について重要な役割を果たしているものと考えられた。

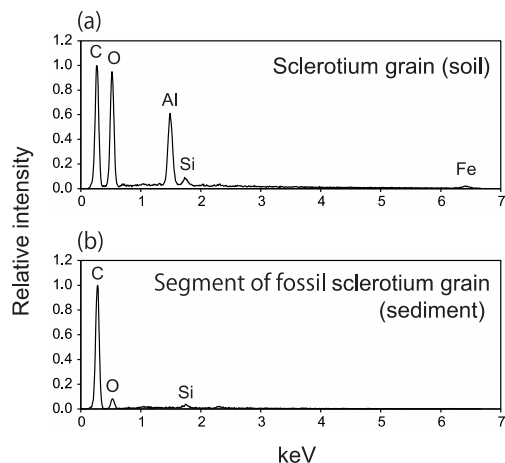


図6 土壌菌核粒子 (a) と堆積物中菌核粒子断片 (b) の X線スペクトル

(6) ペリレン含有断片に含まれるけい素の起源推定

ペリレンを高濃度に含有する断片が、実際にけい素によって構造が維持されているの

であれば、その起源を知ることは構造を推察する上で重要な知見となる。このため、ペリレン含有断片に含まれるけい素の起源について検討を行った。

本検証に用いた菌核粒子断片は、新たに堆積物から採取した。この断片は、高濃度のペリレンを含んでいる (ペリレン: 3,10-ペリレンキノン: DHPQ = 1 : 82 : 129) とともに、主に炭素 (原子%: 83)、酸素 (原子%: 15) およびけい素 (原子%: 2) から構成され、新鮮な菌核粒子に特徴的なアルミニウムは検出されなかった。また、蛍光顕微鏡およびSEM観察の結果から、この断片は細孔構造が比較的少なかった。これらのことから、この菌核粒子断片は、続成過程の最終段階 (図4と同等の段階) にあるものと推察され、また、比較的けい素含量の高い、菌核粒子の外側の層に由来するものと考えられた (M. Watanabe et al., *Soil Sci. Plant Nutir.* 47, 411-418, 2001)。

けい素が菌核粒子断片の形状を維持していると仮定した場合、その起源は菌核粒子自身に由来する可能性と、続成過程で断片内への流入した可能性が考えられた。前述のように、一般的に菌核粒子の外側の層は比較的けい素濃度が高いことが知られており、この菌核粒子断片も菌核粒子内部由来の断片 (~0.4%, 図 6b) と比較してけい素濃度が高かった (~2%)。また、これまでの結果では、続成過程 (4段階) を通してけい素濃度の有意な増加は認められなかった。これらのことから、菌核粒子自身が当初から構造中に含んでいる微量のけい素 (菌核粒子全体で 0.01%, M. Watanabe et al., *Eur. J. Soil Sci.* 58 786-793, 2007) が断片中のけい素の起源であり、堆積物中での続成過程においても断片の形状を維持するのに大きな役割を果たしているものと考えられた。

続成過程においては、けい酸が流入することにより植物等の形状が維持されることは広く知られている (例えば珪化木など)。この場合、けい酸は一般的に石英結晶となっている (P. Matysoá et al., *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 292, 127-143, 2010)。そこで、微小 X線結晶回折によりこの断片の結晶性評価を行ったが、有意な結晶構造は認められず (図 7)、新鮮な菌核粒子と同様のスペクトル (M. Watanabe et al., *Soil Sci. Plant Nutir.* 47, 411-418, 2001) であった。

本研究の結果からだけでは、断片中に流入したけい酸が未結晶の状態では構造を維持していることも否定はできない。しかしながら、先にも述べたように、これまでの結果では続成過程のどの段階においてもけい素量はほぼ一定であった。このことから、続成過程で

けい酸が流入した可能性は低いものと考えられた。

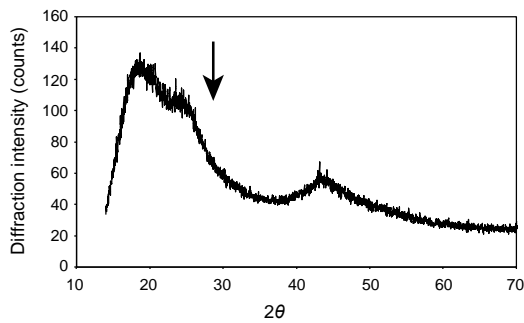


図7 菌核粒子断片のX線結晶回折スペクトル。矢印は、石英結晶が存在する場合にピークが確認できる角度。

(7) ペリレン含有断片に含まれるけい素の存在状態

興味深いことに、白色光下の観察ではこの菌核粒子断片は一部が白色で大部分が透明であった。また前述のように、この断片には有意な結晶構造は認められなかった(図7)。これらのことから、この断片中に含まれているけい素はオパール状ではなく、石英ガラス状として存在しているものと考えられた。またペリレンは、堆積物中ではこの非晶質のけい素化合物により保護された状態で存在するものと考えられた。このような存在状態では、外的な影響を受けにくいため、ペリレンが堆積物中で長期間(2億年以上)(C. Jiang et al., *Org. Geochem.* 31: 1545-1559, 2000)にわたって保存される一つの要因であると推察された。

(8) ペリレンの指標物質としての可能性

*Cg*は菌根菌であるため、一般的に周辺の集水域(樹木の下)に生息している。また、*Cg*は長期的には温暖な気候で増殖し、菌核粒子の存在量が増加することが知られている。これらのことから、堆積物の鉛直分布を調査した際に一過性の増大が認められた場合、長期的なスケールでは一時的な気候の温暖化(N. Suzuki et al., *Org. Geochem.* 41: 234-241, 2010)、短期的なスケールでは洪水等(N. Itoh et al., *Org. Geochem.* 41: 845-852, 2010)の指標として利用できる可能性が示唆された。

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2件)

①伊藤信靖、森の黒い粒が湖底で青白く光るまで、*化学と教育*、査読無、Vol. 61、No. 1、2013、pp. 22-23、無

②伊藤信靖、坂上伸生、鳥村政基、渡邊真紀子、*Perylene in Lake Biwa sediments originating from *Cenococcum geophilum* in its catchment area*、査読有、Vol. 95、2012、pp. 241-251、DOI: 10.1016/j.gca.2012.07.037

[学会発表](計2件)

①伊藤信靖、琵琶湖堆積物のペリレンに対する腐植物質の寄与、2012年11月22日、日本腐植物質学会第28回講演会、首都大学東京(東京都)

②伊藤信靖、琵琶湖底質に含まれるペリレンの起源、2012年07月11日、第21回環境化学討論会、ひめぎんホール(愛媛県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 信靖 (NOBUYASU ITOH)
産業技術総合研究所・計測標準研究部門・
研究員
研究者番号：70415644

(2) 連携研究者

渡邊 真紀子 (MAKIKO WATANABE)
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 (NOBUO SAKAGAMI)
茨城大学・農学部・助教
研究者番号：00564709