

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

※期間：平成27年10月1日～平成29年9月30日まで

【口頭】

1. “Sensing microbes using Au substrates modified with artificial siderophore-Fe³⁺ complexes”, T. Inomata, H. Ido, T. Murase, T. Ozawa, H. Masuda, Pacificchem 2015 (Honolulu, Hawaii, USA) 平成27年12月15-20日
2. “Sensing microorganisms using artificial siderophore complexes-modified Au substrates”, T. Inomata (招待講演), New Challenges of the Surface-enhanced Infrared Spectroscopy (SEIRAS) at the Electrode/Solution Interface (Hokkaido University) 平成28年03月17日
3. 「ハイブリッド型人工シデロフォア-鉄(III)錯体を利用した微生物の検出システムの構築」、遠藤卓・居戸裕樹・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、日本化学会第96回春季年会（同志社大学）平成28年03月24-27日
4. 「植物生育促進因子を指向した人工シデロフォア-Si(IV)錯体の合成とその性質」、鈴木成人・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、日本化学会第96回春季年会（同志社大学）平成28年03月24-27日
5. 「ハイブリッド型人工シデロフォア-鉄錯体による微生物固定化・検出技術の開発」、遠藤卓・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、錯体化学会第66回討論会（福岡大学）平成28年09月10-12日
6. 「植物生育促進因子を指向した人工シデロフォア-Si(IV)錯体の評価」、鈴木成人・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、錯体化学会第66回討論会（福岡大学）平成28年09月10-12日
7. “pH-Dependent Conformational Changes of Hybrid-type Artificial Iron-Siderophore Complexes”, S. Endo, H. Ido, T. Inomata, T. Ozawa, H. Masuda, 日本化学会第97回春季年会（慶應義塾大学）平成29年03月16-19日
8. 「植物生育促進因子を指向した人工シデロフォア-Si(IV)錯体の性質評価」、鈴木成人・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、日本化学会第97回春季年会（慶應義塾大学）平成29年03月16-19日
9. 「人工シデロフォア-Fe(III)錯体の合成 性質と微生物検出技術への展開」、遠藤卓・居戸裕樹・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第27回金属の関与する生体関連反応シンポジウム（東京理科大学）平成29年6月16-17日
10. “Electrochemical detection of microbes using artificial siderophore-iron complexes”, S. Endo, H. Ido, T. Inomata, T. Ozawa, H. Masuda, 錯体化学会第67回討論会（北海道大学）平成29年09月16-18日

【ポスター】

11. 「ハイブリッド型人工シデロフォア-鉄(III)錯体を固定化素子とした微生物検出法の開発」、遠藤卓・居戸裕樹・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第26回金属の関与する生体関連シンポジウム（北海道大学）平成28年06月16-17日
12. 「シデロフォア-葉複合体によるドラッグデリバリーシステム（DDS）を指向したNO放出錯体の構築」、後藤栞・木本雄也・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第26回金属の関与する生体関連シンポジウム（北海道大学）平成28年06月16-17日
13. 「植物生育促進因子を指向した人工シデロフォア-Si(IV)錯体の合成とその性能評価」、鈴木成人・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第26回金属の関与する生体関連シンポジウム（北海道大学）平成28年06月16-17日
14. 「人工シデロフォア-鉄錯体を利用した微生物検出システムの構築」、遠藤卓・居戸裕樹・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第6回CSJ化学フェスタ（タワーホール船堀）平成28年11月14-16日
15. 「植物生育促進因子を指向した人工シデロフォア-Si(IV)錯体の合成と性質」、鈴木成人・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第6回CSJ化学フェスタ（タワーホール船堀）平成28年11月14-16日
16. 「DDSを指向した光応答性一酸化窒素放出金属錯体の合成とその性能比較」、後藤栞・木本雄也・猪股智彦・小澤智宏・増田秀樹、第6回CSJ化学フェスタ（タワーホール船堀）平成28年11月14-16日
17. “High Performance Microbe Detection System Using Hybrid-type Artificial Iron Siderophores”, S. Endo, H. Ido, T. Inomata, T. Ozawa, H. Masuda, 8th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC8) (The University of Auckland) 平成28年12月4-9日

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

【研究の目的】

日本における家畜飼料の国内自給率は低く、トウモロコシなどの家畜用飼料は大部分を輸入に頼っているのが現状である。そのため原産地の天候や地政学的な影響を受けやすく、家畜用飼料の安定な供給には国内自給率を上昇させることが重要である。こうしたトウモロコシなどの家畜用飼料の代替品として、飼料用米が注目を集めている。日本には多くの休耕田が存在し、そのような休耕田を飼料用米の生産に当てることができれば、飼料穀物の国内自給率の上昇だけでなく、休耕田の有効活用など様々なメリットが期待される。しかし飼料用米の生産には、海外の安い家畜用飼料に対抗するため、低コストでの生産が可能であることが求められている。

本申請では、現在輸入に頼っている家畜用飼料の代替品として注目されている飼料用米の普及を図るため、人工シデロフォアを利用した単位面積当たりの飼料用米の収穫量を飛躍的に向上させることが可能な人工成長因子の開発を目的とした。シデロフォアとは、微生物や植物が必須金属イオンを取り込む際に生産・放出される天然のキレート分子である。本申請で利用する人工シデロフォアとは、天然のシデロフォアと同じ金属イオン取込機能を有する合成分子である。本申請では、人工シデロフォアを用いて、イネ科の植物にとって重要な金属イオンである鉄イオンやケイ素イオンの取り込みを促進し、その成長に影響を与えることが可能な新しい成長促進因子の開発を目指す。

【経過】

我々の研究室が開発した人工シデロフォアは鉄イオンを捕捉し、安定な鉄錯体を形成する。またこれらの鉄錯体は大腸菌などの微生物に取り込まれることが判明している。近年、ある植物の根に共生する微生物から、天然のカテコールを鉄捕捉部位として有するシデロフォア（Enterobactin）とケイ素イオンが結合したシデロフォア-ケイ素錯体が単離されているが^[1]、人工シデロフォアによるケイ素錯体の合成に関しては、現在のところ、ほとんど報告例がない。そこで本申請では、特にイネ科の植物の成長にかかせないこのケイ素イオンに着目し、人工シデロフォアによるケイ素錯体の合成とその細胞内への取込による植物成長促進因子の開発を行った。その結果、カテコールを鉄捕捉部位とした人工シデロフォアによるケイ素錯体の合成・単離に成功し、イネの根圏の環境におけるケイ素イオンの放出、および微生物（*E. coli*）への取込を確認した。またヒドロキサム酸を鉄捕捉部位とする人工シデロフォアによるケイ素錯体についても ¹H NMR により、その生成を確認した。

【結果と考察】

本申請では、主に以下の 3 点について研究開発を行った。

- ① 新規人工シデロフォアおよび金属錯体の開発
- ② 新規人工シデロフォア-ケイ素錯体のケイ素イオン放出能力
- ③ 新規人工シデロフォア-金属錯体を用いた微生物に対する取込・増殖実験

以下、項目毎に各研究開発の関する結果と考察を記載する。

【① 新規人工シデロフォアおよび金属錯体の開発（カテコール型およびヒドロキサム酸型）】

まず初めに金属イオン捕捉部位としてカテコールを有するカテコール型人工シデロフォアを設計・合成し、ケイ素イオンを捕捉した複合体である人工シデロフォア-ケイ素錯体を合成した（人工シデロフォアによるケイ素錯体としては最初の例である）。図 1 にその X 線結晶構造解析の結果を示した。この図から、カテコール部位の根元にある窒素原子上の水素原子とケイ素に配位しているカテコール部位の酸素原子の間に水素結合が存在していることが判明した。これらの水素結合の存在がケイ素錯体の安定化に寄与していると考えられる。同様の水素結合は鉄イオンをキレートした鉄錯体においても報告されている^[2]。得られたカテコール型ケイ素錯体の高い安定性は各種溶媒中での ²⁹Si NMR スペクトル測定からも確認された。

一方、ヒドロキサム酸を金属イオン捕捉部位として有する人工シデロフォアを用いたケイ素錯体の合成に関しては、ケイ素イオ

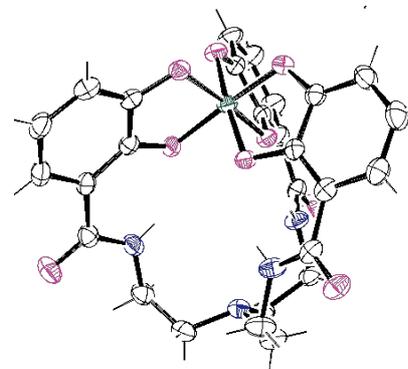


図 1 カテコール型人工シデロフォアによるケイ素錯体の X 線結晶構造解析

ンとヒドロキサム酸型人工シデロフォアとの反応で生成した化合物を¹H NMRにより解析したところ、人工シデロフォアのケイ素への配位を示唆するスペクトルが得られた。現在のところ、X線結晶構造解析に適した単結晶は得られていないが、鉄イオンを捕捉した場合と同様の構造を有していると考えられる。

【② 新規人工シデロフォア-ケイ素錯体のケイ素イオン放出能力】

①で得られたカテコール型人工シデロフォア-ケイ素錯体を用いて、紫外可視吸収スペクトルおよび¹H NMRスペクトルを利用したpH滴定実験を行った(図2)。その結果、中性条件で324 nmに観測されたカテコール部位の芳香環による $\pi-\pi^*$ 遷移に由来する吸収のpHの低下に伴う強度の減少と314 nmへのシフトが観測された(図2左)。314 nmの吸収は酸性条件下における人工シデロフォアの吸収と一致することから、酸性条件下でのケイ素イオンの脱離が示唆された。これはpHの低下によりプロトン(H⁺)がカテコール部位に配位し、ケイ素イオンの脱離を促すためと考えられる。一方、塩基性条件下では、吸収スペクトルは中性条件下でのスペクトルから変化せず、ケイ素イオンの脱離が起こらないことが判明した。図2右はケイ素錯体のカテコール部位の $\pi-\pi^*$ 遷移の強度に関して、その変化量をpHに対してプロットしたものである。この図から、pHが4以下になるとケイ素錯体の $\pi-\pi^*$ 遷移由来の吸収が急激に減少することが判明した。先述のように、酸性条件下ではケイ素イオンが脱離し、最終的にカテコール部位がプロトン化した人工シデロフォアが得られることから、ケイ素イオンの脱離はpH 4以下で起こることが示唆される。従って、この人工シデロフォア-ケイ素錯体からケイ素イオンを取り出すためには、pHを4付近まで低下させる必要がある。イネ科の植物では、様々なメカニズム(鉄(II)イオンの酸化、陽イオンおよび陰イオンの取入バランス、CO₂放出など)を用いて根圏付近のpHを4程度まで下げていることが過去の研究より判明している^[1]。従って、今回合成された人工シデロフォア-ケイ素錯体は、イネの根圏ではケイ素イオンを放出し、イネへのケイ素の取入を促進することができることが示された。

なお、鉄イオンを捕捉した人工シデロフォア-鉄錯体においてもpHが低下することで鉄イオンが外れやすくなること、また捕捉された鉄(III)イオンが鉄(II)イオンへ還元されることで、シデロフォアに配位した鉄イオンが脱離することが、我々の過去の研究により判明している^[2]。

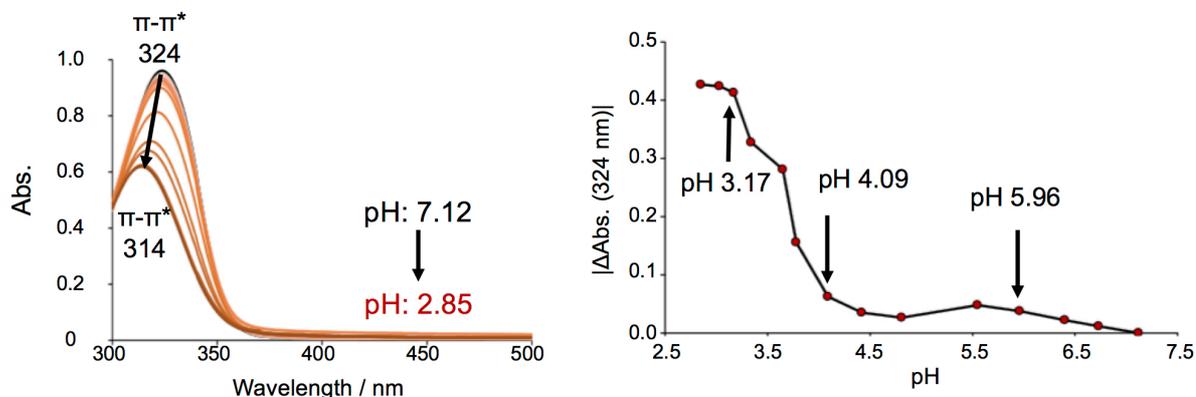


図2 カテコール型人工シデロフォア-ケイ素錯体のpH変化によるUV/vis吸収スペクトル変化(左)とカテコール部位の吸収(324 nm)強度変化のプロット(右)

【③ 新規人工シデロフォア-金属錯体を用いたモデル生物に対する取込・増殖実験】

上記②より、イネの根圏では人工シデロフォア-ケイ素錯体はケイ素イオンを放出し、根を通じて取り込まれることが示唆された。そこで人工シデロフォア-ケイ素錯体が、細胞膜上のレセプタータンパク質を通して、直接細胞内に取り込まれるかどうかについて検討を行った。なお鉄イオンを捕捉した人工シデロフォア-鉄錯体に関しては、効率よく微生物内に取り込まれることは、我々の過去の研究により判明している^[2]。

人工シデロフォア錯体を含む培地を用いた微生物の培養実験を行い、培地中のシデロフォア-ケイ素錯体の含有量の変化から微生物体内への取込の有無を確認した。ケイ素イオンの含有量の変化に関しては、微生物内のケイ素イオンの量を直接評価するのは困難なため、ICP-AES測定により、培養前後の培地中に含まれるケイ素イオンの含有量の変化をもとに見積もった。図3にケイ素-人工シデロフォア錯体の微生物への取込実験の結果を示す。単純にケイ素塩であるNa₂SiO₃を加えた培地で微生物(*E. coli*)を培養したところ、培養前後で培地

中のケイ素原子の含有量はほとんど変化せず、ケイ素塩そのものは微生物により直接取り込まれないことが判明した (図 3a)。したがって、今回用いた *E. coli* に関しては、培地中のケイ素イオンを直接取り込むようなレセプタータンパク質などの機構を持っていないことがわかる。一方、人工シデロフォア-ケイ素錯体を含有した培地を用いて *E. coli* を培養した場合、培地中のケイ素イオンの有意な減少が確認され、*E. coli* の増殖に伴い、培地中の人工シデロフォア-ケイ素錯体が細胞内に取り込まれていることが示唆された (図 3b)。これは人工シデロフォア-ケイ素錯体が *E. coli* により認識され、その細胞内へ取り込まれていることを示している。

E. coli への人工シデロフォア-ケイ素錯体の取込による培地中のケイ素イオンの時間変化を図 4 に示した。培養開始から 4 時間程度では培地中のケイ素錯体の量はほとんど変化しないことが判明した。一方、24 時間後では、培地中のケイ素錯体の眼中量は 34% まで減少した (図 4 中の表参照)。同一条件における *E. coli* の増殖曲線では、最初の数時間は増殖の準備期間である誘導期であり、その後一気に増殖が進行する対数期に入り、24 時間後は増殖による分裂率と死滅率が平行に達する静止期となる。従って、最初の数時間は誘導期のため培地中の *E. coli* の量が少なく、培地中の人工シデロフォア-ケイ素錯体が十分に *E. coli* 中に取り込まれなかったためと考えられる。24 時間後は静止期のため十分な *E. coli* が存在し、培地中の人工シデロフォア-ケイ素錯体が細胞内に取り込まれたため、培地中の 6 割以上のケイ素錯体が減少したものと考えられる。

【まとめ】

本研究ではカテコール型およびヒドロキサム酸型人工シデロフォアを配位子としたケイ素錯体を設計・合成し、その構造および分光化学的性質を明らかにした。またカテコール型人工シデロフォアに関しては、イネの根圏における pH 条件で捕捉したケイ素イオンを放出可能であること、微生物 (*E. coli*) を用いた細胞への取込実験において、実際に細胞内にケイ素錯体が入り込まれることが判明した。現在、実際にイネ科の植物を用いた人工シデロフォア-ケイ素錯体の成長促進因子としての能力を検討しているところである。

【参考文献】

- [1] T. J. N Kenla, M. D. K. Tatong, F. M. Talosti, B. Dittrich, H. Frauendorfa, H. Laatsch, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 7641-7643.
- [2] K. Matsumoto, T. Ozawa, K. Jitsukawa, H. Masuda, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 8538-8546.
- [3] C. B. M. Beg, G. J. D. Kirk, A. F. Mackenzie, H.-U. Neue, *New Phytol.*, **1994**, 128, 469-477.

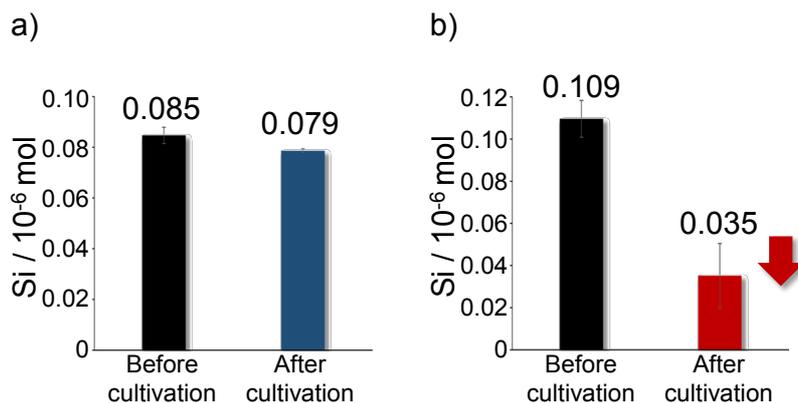


図 3 微生物 (*E. coli*) による培地中のケイ素の取込実験。微生物の培養前後の培地中のケイ素原子の含有量を ICP-AES により測定。a) 10 μM Na₂SiO₃ 含有培地。b) 10 μM ケイ素-人工シデロフォア錯体含有培地。

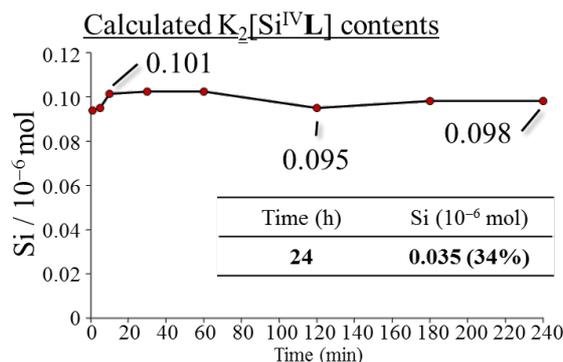


図 4 *E. coli* の培養中における培地中の人工シデロフォア-ケイ素錯体の含有量の経時変化