

土壌主成分フミン酸の構造活性相関

Structure-activity Relationship of Humic Acid, Main Soil Component

研究代表者 群馬大学工学部生物化学工学科 助手

秦野 賢一

Research Associate, Department of Biological and Chemical Engineering,
Faculty of Engineering, Gunma University
Ken-ichi HATANO

Two types of organic matter composts were purified by gel filtration and high-performance liquid chromatography. The purity and identification were checked by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Further, infrared rays and the solid-state nuclear magnetic resonance spectra were obtained and assigned. As a result, the homogeneous composts were assigned to be humic acid and fulvic acid, respectively. As concerns the humic acid, it was revealed that the chemical structure contained a carboxyl group, hydroxyl groups with/without a hydrogen bond. Interestingly, these composts had a proteinase-inhibitory activity as well as chelate effect. The humic acid could inhibit different-class proteinases, papain and chymotrypsin, and the inhibitory mode was different between papain and chymotrypsin.

1. 研究目的

フミン酸は土壌主成分であり、地球上に最も多量に存在する有機化合物である。そして強力なキレート効果を持つことから、足尾鉍毒事件を引き起こした銅やカドミウムイオンなど人体に有害な重金属と錯体を形成することにより無毒化する効果をもつ。また土壌中の鉄などの有用金属を天然水に溶かしだし、川をへて海に運搬する役目も担っている。しかし腐植作用によって動植物の死骸や排泄物などから生成されるためその分子量は不均一で、これまでフミン酸の構造そしてその生成機構の詳細は明らかにされていない。

そこで本研究では、まず腐植化植物組織から単分散フミン酸をゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーそして高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で大量精製した。さらに赤外分光(IR)、質量分析(MS)そして核磁気共鳴(NMR)によりその詳細な化学構造を解析した。またキレート効果の他に新たに発見された蛋

白質加水分解酵素(プロテアーゼ)活性の阻害効果についての特性解析も行った。

2. 研究経過

2.1. 方法

サンプルの精製

試料は腐植化植物組織より 50 mM トリス緩衝液(pH7.9)で抽出し超遠心処理(20,000 rpm)後、その上澄みを回収し凍結乾燥した。つぎに、同緩衝液を用いてゲル濾過カラムに数回かけ、A 及び B 画分を単離精製し、A 画分はさらにイオン交換カラムで精製した。これら画分は HPLC により最終精製を行った。

プロテアーゼ阻害活性測定

プロテアーゼ パパインの阻害活性測定において測定用緩衝液は 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5, 25 °C)を用い基質は N-CBZ-L-lysine *p*-nitro-phenyl ester (以下 CLN)を用いた。キモトリプシン阻害活性測定においては同緩衝液にアセトニトリルを 25 % になるように加え

た。基質は N-CBZ-L-phenylalaine *p*-nitrophenyl ester (以下 CPN)を用いた。阻害形式は Lineweaver-Burk (LB)ならびに Dixon プロットによって明らかにした。pH 依存性の測定は MacIlvain 緩衝液を用い上記と同様に行った。
IR と MS

IR は錠剤成型器と油圧プレス器で KBr サンプル錠剤を作製し、複光束赤外分光光度計で測定した。MS はマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI-)そして電子スプレーイオン化(ESI-)飛行時間型(TOF)MS を用いてサンプルの質量を測定した。標準物質としてブラニキニン、アンジオテンシンそしてインスリン B 鎖を用いた。

固体高分解能 NMR

交差分極マジック角スピニング(CP/MAS)そして ^1H - ^{13}C 二次元異種核化学シフト相関(HETCOR)実験を行った。二次基準物質には、 ^1H は水を ^{13}C はアダマンタンの信号を用いた。

2.2. 結果

Figure 1 に示すように、精製の過程で画分 A (以降、フミン酸)より画分 B を分離することができた。この B 画分は、硫酸酸性で沈殿しないことからフルボ酸であると同定できた。これら両画分の吸収スペクトルは、270 nm 付近に肩があるものの吸光度は長波長になるに従いならかな曲線を描いて減少していく典型的な腐食物質のパターンと同じだった。

両画分の IR スペクトルを Figure 2 に示す。3,400 cm^{-1} ; 水素結合した O-H 伸縮振動、1,600 cm^{-1} ; C=O または COO⁻ 共役している C=C の伸縮振動、1,050 cm^{-1} ; C-O の伸縮振動と両画分の各ピークを帰属した。画分 B と比較すると A 画分は、水素結合 O-H 伸縮振動が強いこと以外はよく一致していた。

LB や Dixon プロットにより明らかとなったキモトリプシンならびにパパイインに対する両画分の阻害様式、定数ならびに至適 pH の結果を Table 1 と 2 にまとめた。

A 画分の MALDI-TOF/MS スペクトルを Figure 3 に示す。分子量が 1,296 の単分散サンプルであり、Bottom スペクトルより 226 毎の質

量の繰り返し構造であることがわかる。また ESI-TOF/MS/MS 実験で、*m/z* が 750 のイオンについてさらに展開して MS 解析した結果、A 画分の最小質量物質は 175 であることも明らかとなった。この分析器での繰り返し構造の質量数は 176 であった。

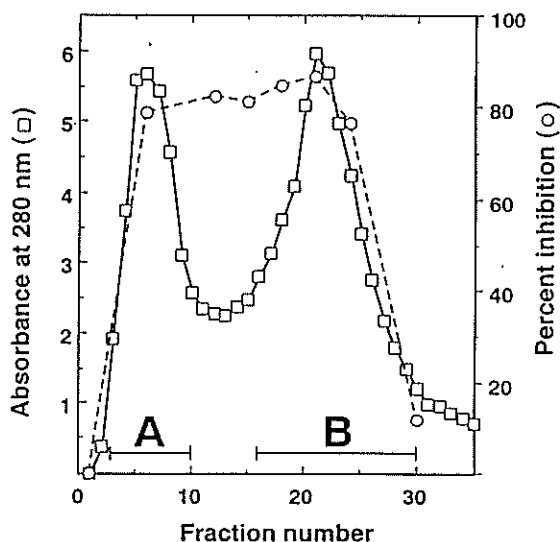


Figure 1. Gel-filtration chromatography of organic matter composites on Sephadex G-50.

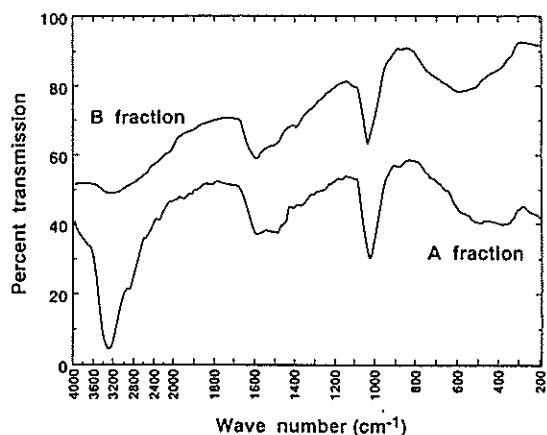


Figure 2. IR spectra of A and B fractions.

Fr.	Ki (M)	Mode	Op. pH
A	5.47×10^{-6}	Uncompetitive	5.5
B	1.83×10^{-4}	Noncompetitive	5.0

Table 1. Inhibitory property toward papain.

Fr.	Ki (M)	Mode	Op. pH
A	4.60×10^{-6}	Noncompetitive	5.5
B	2.74×10^{-5}	Noncompetitive	5.0

Table 2. Inhibitory property of A and B fractions toward chymotrypsin.

のように帰属された:172 ppm; カルボキシ基、131 ppm; 芳香族ならびにオレフィン、104 ppm; アセタール、79, 70 ppm; 水酸基のついた炭化水素、18 ppm; アルキル。また ^1H 周波数の方も以下のように帰属した:9.8, 6.8 ppm; 水素結合した水酸基または芳香族、5.4 ppm; ラクトン、2.2 ppm; 水酸基のついた炭化水素または脂肪族(芳香環に対し α 位炭素)、1.2 ppm; 脂肪族(芳香環に対し β 位炭素)。

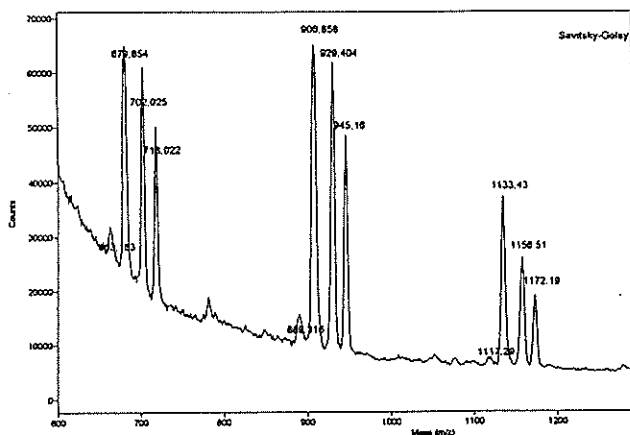
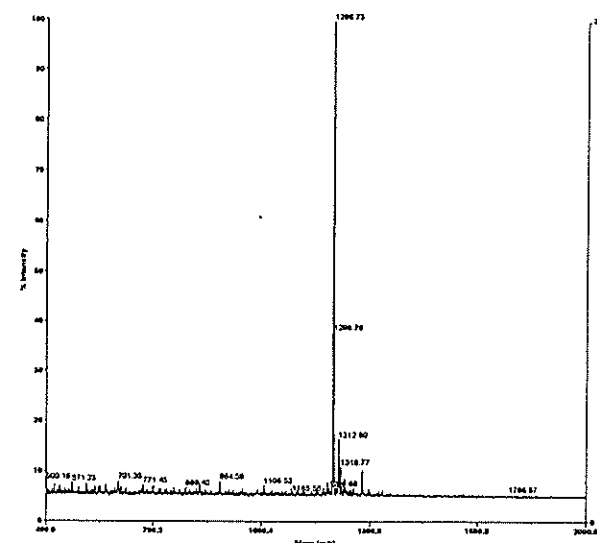


Figure 3. Top; MALDI-TOF/MS spectra of A fraction with laser power 2,600. Bottom; with laser power of 3,000.

Figure 4 に A 画分の CP/MAS ならびに二次元 HETCOR スペクトルを示す。 ^{13}C 周波数の各ピークは化学シフトデータベースをもとに以下

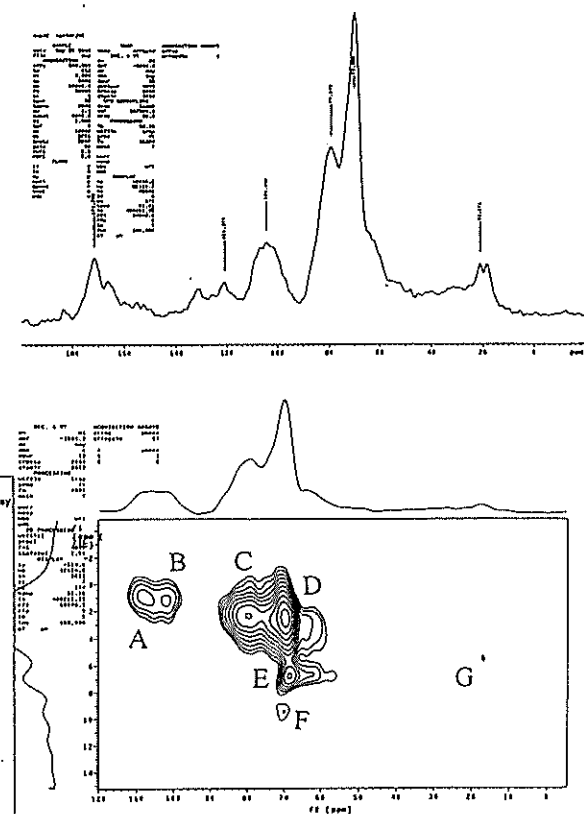


Figure 4. Top; ^{13}C -CP/MAS spectra of A fraction. Bottom; two dimensional ^1H - ^{13}C HETCOR spectra of A fraction.

2.3. 考察

Table 1 と 2 に示したように、フミン酸はクラスの異なるプロテアーゼを酸性側で阻害することがわかった。興味深いことに、各酵素に対する阻害様式もまた異なるといった事が明らかとな

O-H 伸縮振動ピークとの相関(Figure 2)より、フミン酸がフルボ酸よりプロテアーゼ阻害能力が大きいのはその構造内にある強い水素結合によるものだということがわかる。また至適 pH が酸性側に偏っていることより、阻害活性に酸性官能基が関与している事がわかる。それは Figure 4 での 172 ppm のピークの存在によりカルボキシル基であることが明らかとなった。

このフミン酸の構造に関して Figure 3 の Bottom に示すように 226 毎に出現する各ピーク集団には4つのサテライトピークを伴っていて、そのピーク間隔からそれらは酸素が1つそして2つ脱離したものとナトリウムが解離した構造であることがわかる。これはフミン酸の繰り返し構造がエステルまたはエーテル結合で連結していることを意味し、単なる直鎖状の重合反応ではなく最低2ヶ所で繰り返し構造が結合していることがわかる。つまりこのフミン酸は一次元的な構造ではなく二次元、三次元的な構造をとっていることが明らかとなった。

Figure 4 の HETCOR スペクトルより、A, B 交差ピークはオレフィン、C, D ピークは水酸基のついた炭化水素、E, F ピークは水素結合している水酸基のついた炭化水素と帰属でき、CP/MAS でのカルボキシル基と合わせてフミン酸の構造解析に有用な情報が得られた。A, B 交差ピークが得られたことは、先の MS 解析での繰り返し構造が最低でも2箇所連結している結果とも矛盾しない。C, D, E, F ピークから判断すると、水酸基をもった炭素は2種類存在し80 ppm の環境にある炭素に結合しているそれは水素結合には関与せず、70 ppm の炭素の水酸基の環境は3状態あると理解できる。また先の結果より Na イオンの解離の情報が得られたが、これはおそらくカルボキシル基に結合していると思われる。つまりフミン酸のカルボキシル基は、繰り返し構造の重合には関与していない可能性が示唆された。

3. 研究成果

ここで単離精製したフミン酸は、分子量1,297 の単分散サンプルで、176 または 226 の繰り返し構造から成ることを示した。その構造

には、水素結合に関与している水酸基、エーテル結合、カルボキシル基が存在することがわかった。さらに新奇の特性であるプロテアーゼ阻害効果の詳細も明らかにした。

4. 今後の課題と発展

本研究で得られた構造情報をもとに現在ワークステーションで、この単分散フミン酸の様々な三次元構造の可能性をチェックしている。一方、フミン酸と同時に精製されたフルボ酸は腐食物質の経時的特性変化の実験よりフミン酸の前駆物質的存在であると考えられ、フミン酸と比べて非常にシンプルな構造をとっていることが上記の解析法より明らかにされている(データは示さない)。こちらの構造の方がフミン酸よりも矛盾なく解明できると思われるので、今後はこの仕事も本研究と平行して進めフルボ酸の構造をもとにフミン酸の正確な三次元構造を決定していきたい。さらにこの両者の構造活性相関を比較することで、フミン酸の形成過程に関しての知見を得ることを考えている。

近い将来、金属イオンを配位させたフミン酸の金属キレート振動スペクトル(特に 500cm^{-1} 以下の低波数領域)をラマン分光器で解析することによって、金属イオンがフミン酸のどの官能基にどのような状態で配位しているのかを明らかにする予定である。

5. 発表論文リスト

1. 秦野賢一, 瓜島淳, 大野真央, 永田宏次, 田之倉優, 莊司顯: 土壌主成分フミン酸の構造活性相関, 日本生化学会誌, 2000, 72(8), 831.
2. Hatano K., Nagata K., Tanokura M., Shoji A.: Purification and characterization of a novel humic acid from organic matter composts. (投稿準備中)
3. Hatano K., Nagata K., Tanokura M., Shoji A.: Structural characterization of a novel humic acid and fulvic acid. (投稿準備中)