

令和元年6月25日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00521

研究課題名(和文) FT ICR MSを用いた水圏中微量金属元素 - 溶存有機物錯体の分子構造解析

研究課題名(英文) Molecular level analysis of trace metal-organic complex using FT ICR MS

研究代表者

杉山 裕子 (Sugiyama, Yuko)

岡山理科大学・理学部・准教授

研究者番号：40305694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：水中に微量に存在する Cu や Fe などの金属元素は生命活動に必須な元素として知られているが、その大部分が溶存有機物と錯形成を行っていることが知られている。錯生成反応は水圏における生物活動・物質循環を制御しているにもかかわらず、水中に存在する有機配位子の化学構造や供給源については解明されていない。本研究では固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを用いて琵琶湖水試料から Cu-有機配位子錯体の分離・濃縮を行い、フーリエ変換イオンサイクロトロン 共鳴型質量分析による分子の同定を試みた。IMACにより分離された有機配位子は、リグニンおよび脂質・タンパク様物質が主要成分と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、以下のことが明らかになった。

琵琶湖2 mの試料から IMACとC18固相抽出により分離された有機配位子の FT-ICR MS スペクトル解析の結果、141の配位子の分子式を求めることができた。IMACにより分離された有機配位子は、リグニンおよび脂質・タンパク質の分子グループに類似した元素組成を有するものが大半を占めた。しかしながら、炭水化物や縮合タンニンに類似した分子も見出された。これらの知見はすべて新規のものであり、構造不明の有機配位子に対する有用な情報を与えている。今後は MS/MS を活用するなどして、さらに詳細な構造の解析を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Many trace metals are known to be essential for life. Trace metals are also known to make complexes with natural organic ligands in aquatic environment. Metal-organic complexes control variety of important reactions in bioactivities and material cycles, knowledge of the chemical structures or sources of the organic ligands are limited.

We successfully separated the organic ligands from Lake water samples using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) and analyzed the ligands using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS).

We found that Lignin-, Lipid-, and Protein-like molecules were main components of organic ligands separated from lake water DOM using IMAC.

研究分野：環境化学、分析化学

キーワード：有機配位子 IMAC FT ICR MS

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

海洋や湖沼などの水域における生物生産が、リン酸塩や硝酸塩などの栄養塩だけでなく、鉄などの微量元素に制限されていることが知られるようになって久しい。Fe, Cu, Co, Mo, Cr, Zn, Mg など、さまざまな金属元素が生命活動に必須の金属酵素として働くことが知られており、それらの湖沼や海水における植物プランクトンなどへの濃縮係数は数百から数百万に達する (Yamamoto, 1983 など)。Fe や Cu は、実際の河川水・湖沼水・海洋水などにおいては、ほとんどが炭酸イオン・水酸化イオン・そして有機物などと錯体を生成していることがわかっている。陸水中においては特に有機物の寄与が大きく (Maruo et al, 投稿中)、錯形成能を有する溶存有機物は間接的に生物生産の制御を行っている。特に Cu については、フリーイオンが一定濃度以上になると生物に対し毒性を示すが、Cu と錯生成する有機配位子の存在により、フリーイオン濃度が低く抑えられている。つまり有機配位子が銅の毒性を緩和することで生物生産に影響を与えると考えられる。このように、天然水中における溶存有機物による錯形成反応は、天然水中金属の挙動を明らかにする上で重要である。しかし、溶存有機物を系統的に同定し定量する分析技術が十分に確立されておらず、その情報がまだ十分とは言えない。このため、鉄や銅のような遷移金属元素をはじめとして、さまざまな元素が有機物の影響を受けながら地球表層を移動しているが、どの元素についても天然水中での有機物錯体の化学構造は分かっておらず、このことが金属元素の地球循環の経路の一つを不明瞭にしている。

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析 (FT ICR MS) は現在のところ、その検出質量/電荷比から分子式が予想できる質量精度を有する数少ない手法のひとつであり、質量分解能が高いので、天然水中の溶存有機物のような多種多様な化合物の混合物を測定し、網羅的に解析するのに最適である。本研究の初めにはもっとも錯生成能が高い Cu を対象として、モデル化合物や天然水から抽出した溶存有機物との錯生成実験を行い、生成した錯体を FT-ICR MS により分析し、微量元素 - 溶存有機物錯体の化学構造を探る。特に錯生成に重要な官能基や部分構造を明らかにする。最終的には、錯体モデルの作成を試みる。

## 2. 研究の目的

天然水中における溶存有機物による錯形成反応は、天然水中金属の挙動を明らかにする上で重要である。しかしながら金属イオンと有機物の錯体の化学構造は全く判っていない。本研究は天然水から抽出した溶存有機物やモデル有機化合物と銅の錯生成実験を行い、生成した錯体を超高分解能質量分析 (FT ICR MS) により分析し、銅 - 溶存有機物錯体の化学構造を探ることにより、天然水中微量元素 - 溶存有機物の錯生成機構の解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

本申請は、(1) 固定化金属アフィニティクロマトグラフィーを用いた濃縮法の検討、(2) FT ICR MS による金属-有機物錯体の分析条件の検討と解析を行う。天然水の溶存有機物錯体の濃度は未知であるが、個々の化合物の濃度は pmol/L から nmol/L オーダーと推定され、溶存有機物濃度に比べ圧倒的に低い。また、錯体の安定度は金属元素、配位子、水の pH など数多くの因子に影響を受けるため、質量分析を適用する前処理の過程で錯体の化学形態が変わってしまう危険性がある。研究開始時に最も重要なことは天然水試料の分析を行う前段階として、錯体を高い収率で分離濃縮し、化学形態を保存したまま質量分析にかけることのできる条件の設定である。このため、水試料から Cu-有機物錯体を分離濃縮する手法について条件を検討する。錯体自身の分離濃縮を目的として逆相クロマトグラフィーを適用する。また、配位子のみを分離濃縮するために固定化金属アフィニティクロマトグラフィー (Immobilized Metal Affinity Chromatography: IMAC) を試みる。逆相クロマトグラフィーでは極性の異なるいくつかの固相と異なった pH 条件を試し、錯体の分離濃縮に適している条件を探索する。IMAC においては、通常の IMAC に加え、浸透制限型の固定相を合成し、分子量と金属との錯生成能による配位子の分離を試みる。天然水から分離された有機物および IMAC により得られた配位子を使用して Cu-有機物錯体を合成し、これを用いて FT ICR MS 分析条件の検討を行う。こうして確立した錯体の濃縮分離と FT ICR MS 分析の条件にしたがって、天然水中の溶存錯体の分析に取り組む。まずは有機物の影響が現れやすい、淡水域の試料をターゲットとする。

## 4. 研究成果

IMAC による配位子の分離と蛍光スペクトルの特徴：琵琶湖 2018 年 2 月 8 日 17B 地点深度 2 m、89 m の試料水および有機配位子濃縮試料水の EEM スペクトルを、それぞれ図 1、図 2 に示す。

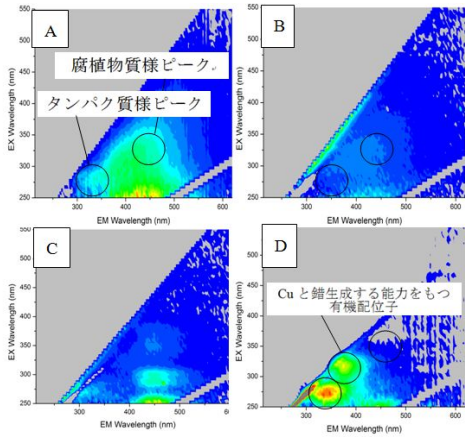


図1 琵琶湖2月8日17B地点 水深2mの試料水におけるEEM  
 A:分離濃縮が行われる前の試料水  
 B:分離濃縮を行った際の通過水  
 C:実験操作のブランク水  
 D:分離濃縮が行われた溶離液

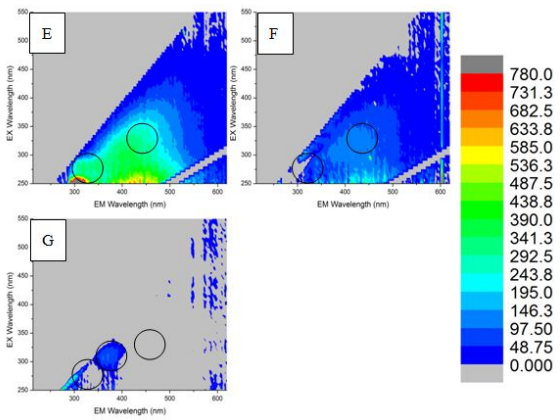


図2 琵琶湖2月8日17B地点 深度89mの試料水におけるEEM  
 E:分離濃縮が行われる前の試料水  
 F:分離濃縮を行った際の通過水  
 G:分離濃縮が行われた溶離液

湖水試料 A、E からは、陸由来の腐植物質様ピーク(Ex/Em = 315/448 nm)、タンパク質様ピーク(Ex/Em = 275/340 nm)が確認された。A と B、E と F を比較すると、B、F ではタンパク質様ピーク、腐植物質様ピークのそれぞれの蛍光強度が減少しており、このピークを有する成分が IMAC により吸着されたことがわかる。また、D、G より、溶離サンプルには Ex/Em = 320/370 nm に蛍光ピークが観測された。深度 2 m、89 m のどちらにおいても、Cu と錯生成する能力をもつ有機配位子は Ex/Em = 320/370 nm 付近に蛍光ピークを示すものであることがわかった。以後、このピークを配位子ピークと呼ぶことにした。

配位子ピーク(Ex/Em = 320/370 nm)の IMAC 担体通過後の通過液の蛍光強度と通過前の試料水の蛍光強度から有機配位子の平均吸着率を見積もった。深度 2 m の琵琶湖サンプルにおいては吸着率 25%、深度 89 m においては 45%であった。次に、溶離体積を 60 mL とした場合の配位子ピークの積算値から算出した配位子の回収率を見積もった。深度 2 m においては回収率 41%、深度 89 m においては 8%であった。

FT ICR MS による配位子の同定: 琵琶湖 2 m の試料 IMAC と C<sub>18</sub> 固相抽出により分離された有機配位子

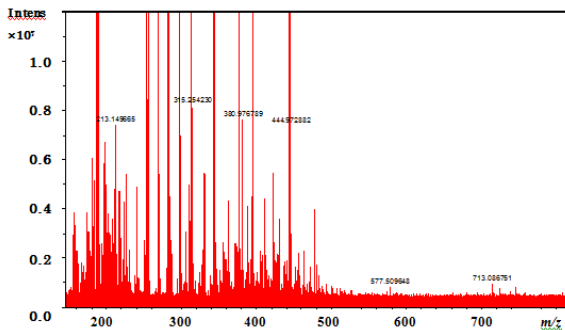


図3 IMAC と C<sub>18</sub> 濃縮を行った琵琶湖水深 2 m の試料の FT-ICR MS スペクトル

子の FT-ICR MS スペクトルを図 3 に示した。表 1 には、m/z = 300.0 ~ 500.0 の範囲で検出された IMAC と C<sub>18</sub> 濃縮を行った琵琶湖水深 2m の試料の MassDefect の小さい(主に 0.5 以下)イオンピークの同定結果の一部を示す。このようにして±0.9 ppm の範囲で分子式を予想することができたピーク数は 141 であった。図 2 は先ほど予想した分子式 141 の有機配位子ピークの同定結果から作成された van Krevelen Diagram (van Krevelen, 1950) である。図 4 には大まかな有機化合物の取り得る範囲をグループごとに四角の範囲で示した (Hockaday et al., 2006)。

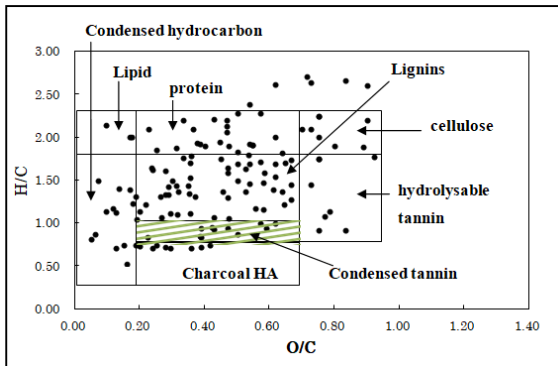


図4 琵琶湖水深2m 湖水から分離された有機配位子の Van Krevelen Diagram

表1 IMAC と C<sub>18</sub> 濃縮を行った琵琶湖水深 2 m の試料の質量イオンピークの同定結果例

実測値 (m/z)	分子式	理論値 (m/z)	誤差 (ppm)	DBE
309.076793	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	309.0768470	-0.2	13.0
327.269135	C <sub>23</sub> H <sub>35</sub> O <sub>1</sub>	327.269339	-0.6	7.0
330.228762	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> N <sub>1</sub> O <sub>5</sub>	330.228597	0.5	3.0
365.043131	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub> P <sub>1</sub>	365.043178	-0.1	11.0
370.149740	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>1</sub>	370.149708	0.1	3.0
380.152161	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub>	380.152197	-0.1	0.0
387.238995	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> O <sub>7</sub>	387.238827	0.4	4.0
396.084143	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	396.084345	-0.5	6.0
400.343258	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N <sub>1</sub> O <sub>4</sub>	400.343233	0.1	2.0
409.244399	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> O <sub>9</sub>	409.244306	0.2	2.0
417.140186	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub>	417.140235	-0.1	7.0
440.119865	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>1</sub> O <sub>11</sub>	440.119834	0.1	10.0

IMAC により分離された有機配位子は、リグニン領域および脂質・タンパク領域を中心に分布した。しかしながら、O/C の大きい炭水化物領域や縮合タンニン領域(図 2 網掛け部分)にも分子が見出された。縮合芳香環領域(Condensed HA)にはほとんど検出されなかった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Jun' ichiro Ide, a, Mizue Ohashi, Katsutoshi Takahashi, Yuko Sugiyama, Sirpa Piirainen, Pirkko Kortelainen, Nobuhide Fujitake, Keitaro Yamase, Nobuhito Ohte, Mina Moritani, Miyako Hara, and Leena Finer: Spatial variations in the molecular diversity of dissolved organic matter in water moving through a boreal forest in eastern Finland, *Scientific Reports*, 7, 37-46, 10.1038/srep42102, 2016

Chen Xu, Saijin Zhang, Yuko Sugiyama, Nobuhito Ohte, Yi-Fang Ho, Nobuhide Fujitake, Daniel I. Kaplan, Chris M. Yeager, Kathleen Schwehr, Peter H. Santschi: Role of natural organic matter on iodine and <sup>239,240</sup>Pu distribution and mobility in environmental samples from the northwestern Fukushima Prefecture, Japan, *Journal of Environmental Radioactivity*, 153, 156-166, 10.1016/j.jenvrad.2015.12.022, 2016

Peng Lin, Chen Xu, Saijin Zhang, Nobuhide Fujitake, Daniel I. Kaplan, Chris M. Yeager, Yuko Sugiyama, Kathleen A. Schwehr, and Peter H. Santschi: Plutonium Partitioning Behavior to Humic Acids from Widely Varying Soils Is Related to Carboxyl-Containing Organic Compounds, *Environmental Science & Technology*, 42, 11751, 10.1021/acs.est.7b03409, 2017

Akihito MOCHIZUKI, Takahiro MURATA, Ko HOSODA, Toshiya KATANNO, Yuji TANAKA, Tetsuro MIMURA, Osamu MITAMURA, Shin-ichi NAKANO, Yusuke OKAZAKI, Yuko SUGIYAMA, Yasuhiro SATOH, Yasunori WATANABE, Ayuriin DULMAA, Chananbaatar AYUSHSUREN, Darmaa GANCHIMEG, Valentin V. DRUCKER, Vladimir A. FIALKOV, Masahito SUGIYAMA: Distributions and geochemical behaviors of oxyanion-forming trace elements and uranium in the Hovsgol/Baikal/Yenisei water system of Mongolia and Russia, *Journal of Geochemical Exploration*, 123-136, org/10.1016/j.gexplo.2018.01.009, 2017

Takayuki Sasaki, Ryohei Goto, Takeshi Saito, Taishi Kobayashi, Takagi Ikuji & Yuko Sugiyama: Gamma-ray irradiation impact of humic substances on apparent formation constants with Cu(II), *Journal of Nuclear Science and Technology*, 55, 1299-1308, 10.1080/00223131.2018.1503573, 2018

### 〔学会発表〕(計 21 件)

土居愛美, 福田吏紗, 澤近美咲, 齋藤達昭, 杉山裕子: 岡山城内堀に溶存する有機物の PARAFAC を使用した蛍光スペクトルの解析, 名城大学, 日本腐植物質学会第 32 回講演会, 2017 年 3 月

湯川孝紀・森本喬也・丸尾雅啓・早川和秀・小畑元・杉山裕子: Pseudopolarography を用いた琵琶湖水中溶存有機配位子の銅錯化容量の測定, 神戸学院大学, 日本陸水学会近畿支部会第 28 回研究発表会, 2017 年 2 月

土居愛美, 福田吏紗, 澤近美咲, 森本喬也, 湯川孝紀, 齋藤達昭, 杉山裕子: 岡山城内堀に溶存する有機物の蛍光スペクトルの特徴について, 神戸学院大学, 日本陸水学会近畿支部会第 28 回研究発表会, 2017 年 2 月

福田吏紗, 土居愛美, 澤近美咲, 森本喬也, 湯川孝紀, 齋藤達昭, 杉山裕子: 岡山城内堀における栄養塩の循環に関する研究, 神戸学院大学, 日本陸水学会近畿支部会第 28 回研究発表会, 2017 年 2 月

森本喬也・湯川孝紀・丸尾雅啓・早川和秀・杉山裕子: 天然水中に溶存する有機配位子の分離について, 神戸学院大学, 日本陸水学会近畿支部会第 28 回研究発表会, 2017 年 2 月

倉橋宏輔・森本喬也・早川和秀・杉山裕子: 琵琶湖湖底の酸素消費に伴って生成する溶存有機物の特徴, 神戸学院大学, 日本陸水学会近畿支部会第 28 回研究発表会, 2017 年 2 月

福田吏紗, 土居愛美, 澤近美咲, 森本喬也, 湯川孝紀, 齋藤達昭, 杉山裕子: 岡山城内堀における栄養塩の形態別分析と循環に関する研究, 琉球大学, 日本陸水学会第 81 回大会, 2016 年 11 月

土居愛美, 福田吏紗, 澤近美咲, 森本喬也, 湯川孝紀, 齋藤達昭, 杉山裕子: 岡山城内堀に溶存する蛍光性有機物の蛍光スペクトルによる特徴づけ, 琉球大学, 日本陸水学会第 81 回大会, 2016 年 11 月

Kumiko TSUDA, Morimaru KIDA, Hajime SATO, Mitsuru HIROTA, Yuko SUGIYAMA, Kazuhide HAYAKAWA, Masayuki KAWAHIGASHI, Bolormaa OYUNTSETSEG, Viacheslav Victorovich KHAKHINOV and Nobuhide FUJITAKE: Determination of aquatic humic substances in lakes and wetlands by the carbon concentration-based DAX-8 batch adsorption technique, Kanazawa Univ., 18th International Humic Substances Meeting, 2016

Kazuhide HAYAKAWA, Reiji KOJIMA, Chizuru WADA, Tomoyo SUZUKI, Yuko SUGIYAMA: Distribution and characteristics of ultraviolet absorption and fluorescence of, Kanazawa Univ., 18th International Humic Substances Meeting (国際学会) 2016 年 9 月 Yuko SUGIYAMA, Mina MORITANI, Nobuhide FUJITAKE, Nobuhito OHTE and Katsutoshi TAKAHASHI: Dissolved organic matter dynamics in a Japanese Cypress Forest, Kanazawa Univ., 18th International Humic Substances Meeting, 2016

Xu, C., Zhang, S., Sugiyama, Y., Ohte, N., Ho, Y.-F., Fujitake, N., Kaplan, D.I., Yeager, C.M.6, Schwehr, K.A., Santschi, P.H: Role of natural organic matter on iodine and Pu distribution and mobility in environmental samples from the northwestern Fukushima Prefecture, The 26th Goldschmidt Conference, YOKOHAMA, 2016

湯川孝紀, 森本喬也, 丸尾雅啓, 早川和秀, 小畑元, 杉山裕子: Pseudopolarography を用いた琵琶湖水中溶存有機配位子の分離及び銅錯化容量の測定, 日本陸水学会第 82 回大会, 2017

浦川泰弘, 土居愛美, 重松直樹, 福田吏紗, 澤近美咲, 齋藤達昭, 杉山裕子: 岡山城内堀に溶存する蛍光性有機物の

PARAFAC 解析-ヒシ成育の有無が成分スペクトルに与える影響, 日本陸水学会第 82 回大会, 2017  
湯川孝紀, 森本喬也, 丸尾雅啓, 早川和秀, 小畑元, 杉山裕子: 琵琶湖水中の溶存有機配位子の分離条件の検討及び Pseudopolarography を用いた銅錯体の条件安定度定数の測定, 日本腐植物質学会第 33 回講演会, 2018  
湯川孝紀, 森本喬也, 丸尾雅啓, 早川和秀, 小畑元, 杉山裕子: Pseudopolarography を用いた琵琶湖水中銅溶存有機配位子の条件安定度定数の測定, 日本陸水学会近畿支部会第 29 回研究発表会, 2018  
浦川泰弘, 森本喬也, 湯川孝紀, 汪達紘, 宮永政光, 小畑元, 杉山裕子: 児島湖に溶存する有機配位子の分離について, 日本陸水学会近畿支部会第 29 回研究発表会, 2018  
杉山裕子: FT-ICR MS を用いた有機物組成解析に基づく森林生態系の有機物の変遷の解明、瀬戸内海流域水文研究会第 17 回研究発表会(招待講演), 2018  
杉山裕子、高橋勝利: 水環境における溶存有機物の生滅・変遷過程-FT ICR MS を用いた分子レベルキャラクタリゼーション, 日本分析化学会第 78 回分析化学討論会(招待講演), 2018  
中村榛那、石坪佳祐、久保洋人、藤田和男、小川知也、杉山裕子: 児島湖における溶存有機物の季節変化, 日本陸水学会第 83 回大会, 2018  
田中志穂・東江友利菜・和田祐輝・土居愛美・斎藤達昭・杉山裕子: 岡山城内堀に溶存する有機物濃度の変化について, 日本陸水学会第 83 回大会, 2018

〔図書〕(計 2 件)

藤永薫、大嶋俊一、菅原庄吾、杉山裕子、千賀有希子、向井浩、山田佳裕: 陸水環境化学, 共立出版, 2017  
青山正和、阿部倫則、池谷康佑、井上弦、川東正幸、木田森丸、杉山裕子、隅田裕明、筒木潔、長尾誠也、福島正巳、藤嶽暢英、真家永光、山本修一、渡邊彰: 腐植物質分析ハンドブック, 農文協, 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 高橋 勝利  
ローマ字氏名: Takahashi Katsutoshi  
所属研究機関名: 国立研究開発法人産業技術総合研究所  
部局名: 生命工学領域  
職名: 主任研究員  
研究者番号(8桁): 00271792

研究分担者氏名: 丸尾 雅啓  
ローマ字氏名: Maruo Masahiro  
所属研究機関名: 滋賀県立大学  
部局名: 環境科学部  
職名: 研究員: 教授  
研究者番号(8桁): 80275156

研究分担者氏名: 早川 和秀  
ローマ字氏名: Hayakawa Kazuhide  
所属研究機関名: 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター  
部局名: 総合解析部門  
職名: 副部門長  
研究者番号(8桁): 80291178

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 小畑元  
ローマ字氏名: Obata Hajime

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。