
 総 説

土壌の有機態窒素の化学形態

 森泉美穂子・松永俊朗

キーワード 土壌, 有機態窒素, 化学形態, 可給態窒素

1. はじめに

土壌に含まれる窒素の多くは有機態として存在する。土壌の有機態窒素から無機化した窒素は、植物への窒素の給源（いわゆる地力窒素）として重要な役割を果たしている（Schimel and Bennett, 2004）。しかしながら、植物への窒素供給の量や速度に大きく関わる土壌の有機態窒素の化学形態については、不明な点が多く残されてきた。Shulten and Schnitzer（1998）は、彼らの総説で、土壌の化学分析と熱分解質量分析の結果をもとに、土壌の有機態窒素の存在形態別割合について、タンパク質態物質が約40%、窒素複素環（heterocyclic nitrogen）態が約35%などと推定した。しかし、近年、固体 ^{15}N NMRなど各種機器分析法による結果から、土壌の有機態窒素の中では、窒素複素環の割合はこれまで考えられてきたより少なく、主成分はタンパク質（ペプチド）であることが明らかにされるとともに、土壌タンパク質は腐植物質と複合体を形成することにより分解抵抗性を持つことを示す証拠が得られてきている（Knicker, 2004 ; Sutton and Sposito, 2005）。本総説では、このタンパク質態窒素を中心に、土壌の有機態窒素の化学形態についての近年の報告を紹介する。なお本稿で言う「腐植物質」には、タンパク質、炭水化物、脂質などの生化学的化合物は含めていない。

2. 非破壊状態分析による土壌の有機態窒素の化学形態

土壌の有機態窒素は固体状態で存在しているので、その化学形態の分析法としては、抽出などの操作なしに固体試料を測定できる非破壊分析法が適している。窒素は ^{15}N が核スピン-1/2を持つので、高分解能NMR測定が可能である。しかし、 ^{15}N の天然存在比は0.4%と低く、磁気回転比も小さいため、相対感度は ^{13}C の1/50しかない。そのため、土壌の有機態窒素分析へ固体 ^{15}N NMR法を適用した報告は、 ^{15}N を濃縮した試料を対象にした例が多く、 ^{15}N 天然存在比の土壌試料については少ない（Mathers *et al.*, 2000）。

その中で、Knicker *et al.*, (1993) は、 ^{15}N 天然存在比の土壌試料の30.4 MHz 固体 ^{15}N CP/MAS (cross polarization magic angle spinning) NMR測定結果を初めて報告した。その論文には、N含量が0.9%と多いドイツ Ismaning の“black” calcaric Regosol 土壌のスペクトルが示されているが、アミド（ペプチド）基に帰属されるピークのみが観測された。また、土壌を水酸化ナトリウム抽出して得られた腐植酸およびフルボ酸の ^{15}N CP/MAS スペクトルには、アミノ基の小さなピークが、とくにフルボ酸で見られたが、主なピークは同様にアミド基由来であった。そして、アミド基由来ピークの全ピーク面積に対する割合は腐植酸のスペクトルでは86%、フルボ酸のスペクトルでは83%であった。さらに、土壌全窒素の78%が残存していた水酸化ナトリウム抽出残渣画分のスペクトルには、抽出前の土壌と同様、アミド基のピークしか観測されなかった。また、Schmidt *et al.* (1997) は、常磁性の鉄など無機物を除いて分解能と感度を上げるために10%フッ酸処理した土壌試料の30.4 MHz 固体 ^{15}N NMR測定を報告した。Haplic Alisol 土壌の粘土画分試料の場合、フッ酸処理前 (N: 5.8 g/kg) では100万回以上の積算でもスペクトルは得られなかったが、フッ酸処理後 (N: 17.6 g/kg) では52万回積算でシグナルノイズ比の高いスペクトルが得られた。スペクトルには、大きなアミド基のピークと小さなアミノ基のピークが観測された。その後、フッ酸処理した土壌試料についていくつか同様な結果が報告されている（Dick *et al.*, 2005 ; Smernik and Baldock, 2005）。

このように、これまで ^{15}N 天然存在比の土壌試料の固体 ^{15}N NMR測定で観測されたピークは主にアミド基であり、窒素複素環のピークは検出されていない。ただし、腐植化度が高い腐植酸の固体 ^{15}N NMRスペクトルでは、腐植酸中の窒素の10~30%に相当する窒素複素環のピークが観測されている（Mahieu *et al.*, 2000 ; Maie *et al.*, 2006）。Smernik and Baldock (2005) は、 ^1H が直接結合していない窒素複素環では交差分極（CP）の効果が小さいため、土壌試料の固体 ^{15}N CP/MAS NMR測定においては、窒素複素環は相対的に小さなシグナルを与える可能性を報告している。土壌の固体 ^{13}C NMR測定ではピークの定量性に関する検討が行われている（Smernik, 2005）が、固体 ^{15}N NMR測定においても同様な検討が必要であろう。またSchmidt-Rohr *et al.* (2004) は、固体SPIDER (saturation-pulse-induced dipolar exchange with recoupling) $\{^{14}\text{N}-\}^{13}\text{C}$

Mihoko MORIIZUMI and Toshiro MATSUNAGA: Chemical forms of soil organic nitrogen

 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター
 (305-8666 つくば市観音台3-1-1)

2008年6月26日受付・2009年3月20日受理

日本土壌肥科学雑誌 第80巻 第3号 p. 304~309 (2009)

NMR法を、水田土壌の腐植酸に適用し、窒素に直接結合している炭素を測定した。その結果、アミド態窒素は全窒素の約4/5で窒素複素環は20%弱であること、およびアミド態窒素の多くはペプチドだが、アニリド態も存在することを報告している。

固体NMR以外の非破壊状態分析法としては、最近、シンクロトロン放射光を用いた窒素K吸収端XANES(X線吸収端近傍構造)分光法による土壌中窒素の分析が報告されている。Vairavamurthy and Wang (2002)は底質(フロリダ湾など)や腐植酸・フルボ酸(国際腐植物質学会など)、Jokic *et al.* (2004)はカナダSaskatchewanの湿地土壌(Rego Humic Gleysol)を供試した。その結果、アミド態の主ピークとともに窒素複素環(ピリジン、ピロール)態のピークも一部ながら観測された。また、Abe and Watanabe (2004)は、日本の黒ボク土などから抽出した腐植酸中窒素の状態分析を、MgK α 線を用いたXPS(X線光電子分光)法により行った。窒素1s内殻の光電子スペクトルには複数成分が重なったピークが見られた。そこで、カーブフィッティング計算により、芳香族N、ペプチド結合N、第1アミンNにピーク分離したところ、それぞれ全ピーク面積の3.0~18.7%, 66.7~90.1%そして6.9~16.7%という結果であった。

以上、各種非破壊分析法による土壌固相中の窒素の状態分析の結果について述べてきた。固体 ^{15}N NMRは窒素複素環の量を過小評価している可能性はあるが、XANESなどの結果を合わせて考えると、土壌の有機態窒素の大部分(2/3以上)はアミド態であり、窒素複素環態は腐植化度の高い土壌など多い場合でも1/3程度であると言える。アミド態窒素は、次節に述べるように主にタンパク質(ペプチド)由来と考えられるから、Shulten and Schnitzer (1998)が推定した値より、実際はタンパク質態窒素の割合は多く、窒素複素環の割合は少ないということになる。

また、溶液中の有機物を対象とした簡易非破壊分析としては、1980年代以降、3次元蛍光分光分析(3EEMs; 3 dimensional excitation-emission matrices fluorescence spectroscopy)が用いられるようになった。3EEMsは、溶液中の蛍光物質を網羅的に測定する手法で、海水や陸水の溶存有機物のフルボ酸、腐植酸、タンパク質様物質などに特定の蛍光ピークが認められることを利用して、溶存有機物のキャラクタリゼーションに用いられている(Coble *et al.*, 1990; Nagao *et al.*, 2003ほか)。3EEMsにより、土壌の水抽出物にタンパク質様有機物が認められることが報告されている(Corvasce *et al.*, 2006)。また、Maie *et al.* (2007)は、沿岸海水中の溶存有機物のタンパク質様物質の蛍光強度と溶存有機態窒素(DON)に相関が認められることを示している。Her *et al.* (2003)は、サイズ排除クロマトグラフィーにより分子量別に得たフラクションの3次元蛍光分析を行い、湖水では、数万Da程度の高分子量の部分に多糖類とタンパク様物質が多いことを明らかにした。その他、3EEMsを簡便化して、草地からの

家畜糞由来のタンパク質態有機物を測定しようという試み(Baker, 2002)も行われている。

3. 加水分解および熱分解分析による 土壌の有機態窒素の構成成分

土壌に含まれるアミド態や窒素複素環態など有機態窒素の分子構造をより明らかにするために、有機態窒素に加水分解や熱分解などの操作を加えて分解して構成成分を取り出した後に、その定性または定量分析が行われている。

1) 土壌のアミノ酸およびアミノ糖の分析

アミノ酸組成は、どの土壌でも中性アミノ酸が約50%近くを占め、グリシン、アラニン(中性)、アスパラギン酸(酸性)、アルギニン(塩基性)などのアミノ酸が多く存在する(Hayashi and Harada, 1969; Stevenson, 1982ほか)。これらのアミノ酸組成から、土壌のアミノ酸は、微生物によって生合成されたものが主体と考えられている。土壌のアミノ酸は、土壌を直接あるいは抽出した土壌有機物を塩酸加水分解後、液体クロマトグラフィー等で分離分析することにより測定されている。塩酸加水分解により得られる土壌のアミノ酸由来の窒素は、全窒素の20~40%であると報告されている(Bremner, 1965; Stevenson, 1982ほか)。この結果はNMR測定等で得られた有機態窒素の2/3以上がペプチド態であるという結果と異なっている。しかし最近、Martens and Loeffelmann (2003)は、従来行われていた塩酸加水分解をメタンスルホン酸による加水分解に代えることによって、土壌の窒素の95~98%が、アミノ酸およびアミノ糖として回収されたことを報告している。これまでの塩酸加水分解では、土壌タンパク質の分解が不十分であった可能性がある。また、土壌のアミノ酸含量は、冷涼な地域よりも温暖な地域の土壌の方が多く(Sowden *et al.*, 1977)、有機態炭素量および粘土含有量と正の相関があることが報告されている(Senwo and Tabatabai, 1998)。土壌有機物の分子量は数百~数万Daに及ぶことが報告されており様な物質ではないことが推察されている。土壌からピロリン酸(pH 13)で抽出したフミン酸をポリアクリルアミドゲル電気泳動(SEC-PAGE)により分子量別に3分画し、各画分のアミノ酸量を測定すると分子量の大きな画分は11~20%のアミノ酸を含むのに対し、分子量が小さい画分は、2~5%のアミノ酸しか含まないことが報告されている(Trubetskaya, 1998)。これらの各画分のアミノ酸組成は類似しており、分子量別に差は無かった。また、沿岸性堆積物(Washington coast sediments)のNaOH抽出有機物の、分子量別(<3kDa, 3-10kDa, 10-100kDa, >100kDa)アミノ酸組成分析の結果では、抽出されるアミノ酸の種類が分子量により異なることが見いだされている(Nunn and Keil, 2005)。すなわち、最も分子量が小さい画分(<3kDa)は、続成作用によって形成されやすいグリシン、リシン、非生物性アミノ酸などに富むことから生物性および非生物性有機物の分解物が主たる構成物とされ、3-10kDa画分と10-100kDaの画分は、ア

スパラギン酸に富むことから生物性タンパク質の分解物が多いと考えられている。分子量の大きい画分 (>100kDa) の有機物は、特別に富むアミノ酸はないことから、比較的新しい生物性タンパク質起源のアミノ酸と推定されている。この結果は、中部大西洋における沿岸水中の溶存有機物の分子量 10kDa 以上の有機物の見かけ上の ^{14}C 年代が 40 年以内であったのに対し、低分子有機物 (1-10kDa) では、380~4500 年前であったという報告 (Guo *et al.*, 1996) と調和的であり、海洋中では、比較的低分子の有機物が安定で、有機物の貯蔵庫の役割を果たしている可能性が指摘されている。こうした報告は土壌有機物を対象としたものではないが、興味深い。

アミノ酸には、グリシンを除いて L 体および D 体の光学異性体が存在する。生物が合成するアミノ酸は多くが L 体であるが、D-グルタミン酸や D-アラニンが、バクテリア細胞壁のペプチドグリカンおよびタイコ酸に存在していることが知られている (甲斐ら, 1976; Voet and Voet, 1995)。土壌中にも D 体および L 体のアミノ酸が存在することが知られており、甲斐ら (1976) は、D 体アミノ酸含量から、土壌中の有機態窒素の 20~60% がペプチドグリカンなど細胞壁成分由来だと推定している。また、土壌の耕作期間が増加すると、土壌の D-アラニンと D-グルタミン酸の含有量が L 体に比べて増加するが、これは、土壌有機物の分解が進む過程で、バクテリアのプロテアーゼに対する D-アラニン部分の分解抵抗性 (Voet and Voet, 1995) によりペプチドグリカンが選択的に残された結果だと考えられている (Amelung, 2003)。

生物の死後、生化学的な制御が無くなると、アミノ酸の L 体から D 体へのラセミ化反応が進行する。恒温条件下では、アミノ酸の D/L が時間と共に一定の割合で増加することを利用して試料の年代を推定することができる。リシンは、塩酸加水分解によるラセミ化が起こる割合が非常に小さい (1% 程度) ことから、土壌有機物の年代を反映すると考えられ、土壌有機物の年代測定に用いられている。イギリスの草地土壌のリシンのラセミ化を用いた有機物の年代は約 100 年であり、放射性 C から求めた年代 (約 200 年) とほぼ一致することが報告されている (Amelung 2003, Amelung *et al.*, 2006)。

土壌のアミノ糖は主として①グルコサミン、②マンノサミンとガラクトサミン、③ムラミン酸であり、それぞれが①糸状菌のキチン、②バクテリアの生産物、③バクテリアのペプチドグリカンのバイオマーカーとされている (Amelung, 2001)。バクテリアのペプチドグリカンの中では、D-アラニンは、ムラミン酸と 1:1 の割合で存在しており、土壌中の両者もほぼ 1:1 で含まれていることから、土壌中の D-アラニンおよびムラミン酸はバクテリア起源と推定されている。土壌のアミノ糖含量は、平均気温 12~15℃の土壌で最も多く、それよりも温度が高くても低くても少ない (Amelung *et al.*, 2006)。また、草地から耕作地に転換すると、アミノ糖は、最初の約 13 年間で急

速に減少し、それ以降は当初の草地の 60% 程度の含量を維持するという報告もあり (Lobe *et al.*, 2001)、土壌のアミノ糖は主として微生物活動に由来するため、気候や土地利用に大きく影響を受けると考えられる。

2) 熱分解分析による土壌の有機態窒素の測定

熱分解-GCMS 法 (Py-GCMS) は、土壌の有機物測定に 1960 年代から使用され始め、現在では、腐植物質などの特性解析の常法となっている。この方法は、熱分解において非極性あるいは微極性の化合物 (例えば、炭化水素) を生成する物質 (例えば、堆積岩中のケロジェン) の分析に適している。Py-GCMS による土壌中あるいは腐植物質画分中のアミノ酸やタンパク質由来の有機化合物は、窒素化合物で 30 ほど報告されている (山本ら, 2007)。アミノ酸の熱分解では、加熱温度によって脱水、脱炭酸、脱アミノ反応による生成物の量が異なり、低温 (200~300℃) では、ピロール、ピリジンが主に生成するが、高温 (500℃) では、芳香族化合物 (ベンゼンアセトニトリル、インドール) などが生成する。これらは、アミノ酸の基本骨格を維持しているか、環化されたものであり、起源となるアミノ酸を反映している。しかしながら、アミノ酸構成物とは隔たりの大きい生成物もある。例えば、アスパラギン酸からピロール類、アラニンからピリジン類など、元の構造を反映しない生成物も生じる。したがって、この方法を使用して、起源物質の正確な定量を行うことは難しい。Shulten and Schnitzer (1998) は、塩酸加水分解によるアミノ酸分析と Py-GCMS で得られた窒素化合物からその起源を推定し、土壌有機物中の窒素は、タンパク質態物質 (タンパク質やアミノ酸) 約 40%、アミノ糖 5~6%、窒素複素環態 (プリンやピリジンを含む) 35%、 NH_3 19% から構成されるとした。しかし、その後、土壌の塩酸加水分解残渣から、鉄およびアルミニウム酸化物を可溶化する DCB (dithionite citrate bicarbonate) で抽出した有機物 (窒素量としては残渣の 13~61%) の熱分解 FI-MS 分析および加水分解アミノ酸分析を行った結果、非加水分解性窒素の約 29% がアミノ酸であり (Leinweber and Shulten, 2000)、当初考えられていた以上にタンパク質態物質が存在していた。

近年、使用され始めた熱分解メチル誘導体化 GCMS 法 (Py-TMAH-GCMS) は、熱分解によって極性の高い化合物を生成する高分子有機物 (リグニン、タンパク質、炭水化物、脂質) や土壌有機物の分析に適している。Py-TMAH-GCMS では、アミノ基 (一部を除く) とカルボキシル基が共にメチル化され、一部のアミノ酸を N-dimethyl carboxylic methyl ester などのメチル化合物として検出することができる。TMAH-GCMS 法による土壌および腐植物質の分析では、メチル化アミノ酸 21 種類が検出されているほか、ピロール、ピリジン、インドールなど多様な窒素複素環化合物が検出されている (山本ら, 2007; Chefetz *et al.*, 2000, 2002)。しかしながら、熱分解により生成した窒素複素環化合物と天然の窒素複素環化合物を区別することは出来ず、有機態窒素の存在形態別

の定量を行うことは難しい (Chefetz *et al.*, 2002). また, TMAH-GCMS および ^{15}N NMR 法により, 1.4 億年前の油母頁岩中にタンパク質様物質が存在するという報告がなされた (Mongenot *et al.*, 2001). 従来, 容易に微生物あるいは化学的分解を受けて消失すると見なされていた有機物が, 地質学的年代にわたって保存される可能性が指摘されている (del Rio *et al.*, 2004).

以上をまとめると, 土壌のアミド態窒素は主にタンパク質 (ペプチド) 態であり, 一部はペプチドグリカンも含まれると考えられる. そして, これらアミド態窒素の多くは微生物に由来する可能性が高い. また, 窒素複素環態は, 多様な含窒素五員環や六員環を分子構造に持っている.

4. 土壌のタンパク質態窒素の分解抵抗性構造

タンパク質が土壌に蓄積するためには, 土壌微生物由来のプロテアーゼに対して分解抵抗性を有している必要がある. その分子科学的な機構としては, ①土壌タンパク質と腐植物質との相互作用, ②土壌タンパク質と鉱物との相互作用, ③土壌タンパク質自身の分解抵抗特性などが考えられている (Rillig *et al.*, 2007; Kleber *et al.*, 2007; Quiquampoix and Burns, 2007). しかし, それらの機構を直接的に証明した報告の数は少ない現状にある.

土壌腐植物質の存在形態については, 従来の高分子 (macromolecular あるいは polymer) モデルに対して, 近年, 超分子 (supramolecular) モデルという考え方が提案されている (Sutton and Sposito, 2005; Schaumann, 2006). このモデルは Piccolo (2001) によるもので, 低 pH 処理した腐植酸が低分子化することをサイズ排除クロマトグラフィーにより測定した結果などから, 溶存腐植物質の存在形態として, 低分子の腐植物質が主に非共有結合により自己集合した超分子構造を提案した. それを受けて, Simpson (2002) は, 酢酸処理して凝集体構造を壊した (Piccolo *et al.*, 1996) ピート腐植酸の溶液 DOSY (diffusion ordered spectroscopy) ^1H NMR 測定を行い, 試料溶液中の分子群 (ケミカルシフト) 別に拡散係数を測定した. その結果, 分子量数万の腐植酸を酢酸処理したとき, 分子量 2000~2500 のリグニン, ~1000 のペプチド, 200~600 の多糖が観測された. この結果は, 腐植酸がペプチドも含めた複合体であることの証拠といえよう. さらに最近, Simpson *et al.* (2007) は, 0.1 M NaOH 抽出後の土壌を 0.1 M NaOH+6M 尿素, ジメチルスルホキシド+6% H_2SO_4 で処理することにより, 70% 以上のヒューミンを可溶化して, 溶液 ^1H NMR 測定に供した. その結果, スペクトルにはペプチド, 脂肪族化合物, 炭水化物, ペプチドグリカンおよびリグニンのピークが観測され, これらピーク分子は diffusion edited 測定から高分子 (または凝集体) として存在していた. これらは, 実試料を対象にして, 土壌タンパク質-腐植物質複合体の存在を直接的に示した数少ない報告である.

Knicker and Hatcher (1997) は, 土壌や底質中などで

タンパク質が難分解性化する構造として, 腐植物質によるタンパク質の encapsulation (包接) を提案した. この仮説は高分子モデルに立脚するものと言えようが, それを実証するために, Zang *et al.* (2000) は, ^{15}N ラベルした藻類タンパク質と, ピート腐植酸を試験管内でアルカリ下で混合して調製したモデル包接複合体を, 6M HCl で加水分解し, 固体 ^{15}N NMR 測定した. その結果, 加水分解処理後も, アミド態ピークが一部残存していたことから, 腐植物質の包接によるタンパク質の難分解性を支持する証拠としている. また最近, Hsu and Hatcher (2005, 2006) は, ピート腐植酸と溶液中で混合した ^{15}N ラベルしたペプチドの二次元 ^{15}N - ^1H HSQC NMR スペクトルを測定し, 腐植酸との相互作用によるペプチドの ^{15}N - ^1H 相関ピークの変化を解析して, ペプチドが腐植酸と共有結合する可能性を示した. しかし彼らも述べているように, そのような相互作用が土壌環境中에서도起きているかは定かではない. 以上のことから, 土壌タンパク質と腐植物質との複合体が土壌の液相および固相で存在していることは確かそうではある. しかし, そのさらなる検証とともに, 複合体の構成成分や高次構造の詳細な解明が必要である.

また, タンパク質を試験管内で鉱物と結合させると分解抵抗性が増すが, 古くから知られている (Ensminger and Gieseking, 1942). Leinweber and Schulten (2000) は, 6M HCl 処理後の土壌を DCB 処理すると, 鉄などとともにペプチドが抽出されたことから, ペプチドは酸化鉄と相互作用している可能性があることを報告した. しかし, 彼らも述べているように, 酸化鉄などと結び付いた腐植物質にペプチドが保持されている可能性もある. また前節で, ペプチドグリカンの分解抵抗性について述べた. しかし, 環境水中の溶存有機態窒素の主体はペプチドグリカンであることが報告されている (McCarthy *et al.*, 1998) が, それがペプチドグリカンの分解抵抗性によるかどうかについては, 明確にはなっていない (Kitayama *et al.*, 2007).

5. お わ り に

本総説で述べたように, 近年の報告は, 土壌の有機態窒素は主にタンパク質態であり, 窒素複素環態はそれほど多くないことを示している. これは, 土壌に含まれる有機物全体をみた場合でも, タンパク質態の占める割合がかなり多いことを意味している. たとえば, 土壌の有機態窒素の 2/3 がタンパク質態で, その窒素係数が 6 だとすると, CN 比 10 の土壌では, タンパク質態の割合は土壌の有機態窒素の 40% に上るということになる.

これらのタンパク質態有機物は, タンパク質そのものとして存在するだけでなく, 多くは腐植物質など他の土壌有機物と共に, 超分子あるいは高分子複合体の一部として存在している. したがって, その存在化学形態により, タンパク質態の分解特性は大きく影響を受けると考えられる. 土壌の有機態窒素から無機化する窒素 (いわゆる地力窒素) の化学形態は, 窒素複素環態ではなくタンパク質態である

と考えられている (Mengel, 1996) . しかし, その給源有機物が「タンパク質」という同じ分子形態を持っていたとしても, 分解過程や分解速度は, その存在化学形態により多様なものとなることが予想される. 例えば, 腐植物質と超分子または高分子複合体を作っているようなタンパク質は, 微生物遺体そのもののタンパク質よりも微生物の攻撃を受けにくく分解抵抗性を持つことが予想されるし, 微生物遺体でもペプチドグリカンにD体アミノ酸が存在するために分解されにくいと考えられている.

また, これまで, 可給態窒素の評価法として様々な抽出法が提案されてきたが, 抽出される有機態窒素の実態については, 例えばリン酸緩衝液抽出法ではタンパク質態であるという報告がある (Matsumoto *et al.*, 2000) もの, 不明な点が多く残されている. 今後は, 抽出される有機態窒素の存在化学形態を考慮しつつ可給態窒素の評価を行う必要があるだろう. 一方, 植物は様々な物質を根から分泌することから, 超分子的に集合する土壌有機物の存在形態に作用し (Piccolo *et al.*, 2003), 超分子を形成するタンパク質の可溶化を促進する可能性もある. 植物根圏における窒素供給という点でも, 土壌のタンパク質態窒素の高次構造の解明は重要であろう.

文 献

- Abe, T., and Watanabe, A. 2004. X-ray photoelectron spectroscopy of nitrogen functional groups in soil humic acids. *Soil Sci.*, **169**, 35–43.
- Amelung, W., 2001. Methods using amino sugar as markers for microbial residues in soil. In R., Lal, J. M., Kimble, R. F., Follett, and B. A. Stewart (ed) Assessment methods for soil carbon, p. 233–272, Lewis Pub., Boca Raton.
- Amelung, W. 2003. Nitrogen biomarkers and their fate in soil. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.*, **166**, 677–686.
- Amelung, W., Zhang, X., and Flach, K.W. 2006. Amino acids in grassland soils: Climatic effects on concentrations and chirality. *Geoderma*, **130**, 207–217.
- Baker, A. 2002. Fluorescence properties of some farm waste: implications for water quality monitoring. *Water Research*, **36**, 189–195.
- Bremner, J. M. 1965. Organic nitrogen in soils. In W. V., and Bartolomew, F. E. Clark (ed) Soil Nitrogen. p. 93–149, American Society of Agronomy, Madison.
- Chefetz, B., Chen, Y., Clapp C. E., and Hatcher P. G. 2000. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **64**, 583–589.
- Chefetz, B., Tarchitzky, J., Deshmukh, A. P., Hatcher, P. G., and Chen, Y. 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **66**, 129–141.
- Coble, P. G., Green, S. A., Blough, N. V., and Gagosian R. B. 1990. Characterization of dissolved organic matter in the Black sea by fluorescence spectroscopy. *Nature*, **348**, 432–435.
- Corvasce, M., Zsolnay, A., D' Orazio, V., Lopeza, R., and Mianoa T. M. 2006. Characterization of water extractable organic matter in a deep soil profile. *Chemosphere*, **62**, 1583–1590.
- del Rio, J. C., Olivella, M. A., Knicker, H., and de las Heras, F. X. C. 2004. Preservation of peptide moieties in three Spanish sulfur-rich Tertiary kerogens. *Organ. Geochem.*, **35**, 993–999.
- Dick, D. P., Gonçalves, C. N., Dalmolin, R. S. D., Knicker, H., Klamt, E., Kögel-Knabner, I., Simões, M. L., and Martin-Neto, L. 2005. Characteristics of soil organic matter of different Brazilian Ferralsols under native vegetation as a function of soil depth. *Geoderma*, **124**, 319–333.
- Ensinger, L., Gieseking, J. E. 1942. Resistance of clay-adsorbed proteins to proteolytic hydrolysis. *Soil Sci.*, **53**, 205–209.
- Guo, L., Santschi, P. H., Cifuentes, L. A., Trumbore, S. E., and Southon, J. 1996. Cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the Middle Atlantic Bight as revealed by carbon isotopic (^{13}C and ^{14}C) signatures. *Limnol. Oceanogr.*, **41**, 1242–1252.
- Hayashi, R., and Harada, T. 1969. Characterization of the organic nitrogen becoming decomposable through the effect drying of a soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **15**, 226–234.
- Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., and Yoon, Y. 2003. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Res.*, **37**, 4295–4303.
- Hsu, P.-H., and Hatcher, P. G. 2005. New evidence for covalent coupling of peptides to humic acids based on 2D NMR spectroscopy: a means for preservation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 4521–4533.
- Hsu, P.-H., and Hatcher, P. G. 2006. Covalent coupling of peptides to humic acids: structural effects investigated using 2D NMR spectroscopy. *Org. Geochem.*, **37**, 1694–1704.
- Jokic, A., Cutler, J. N., Anderson, D. W., and Walley, F. L. 2004. Detection of heterocyclic N compounds in whole soils using N-XANES spectroscopy. *Can. J. Soil Sci.*, **84**, 291–293.
- 甲斐秀昭・河口定生・丸本卓哉 1976. D-アミノ酸の土壌中分布とその土壌窒素代謝における意義. 土と微生物, **18**, 27–41.
- Kitayama, K., Hama, T., and Yanagi, K. 2007. Bioreactivity of peptidoglycan in seawater. *Aquatic Microbial Ecology*, **46**, 85–93.
- Kleber, M., Sollins, P., and Sutton, R. 2007. A conceptual model of organo-mineral interactions in soils: self-assembly of organic molecular fragments into zonal structures on mineral surfaces. *Biogeochemistry*, **85**, 9–24.
- Knicker, H. 2004. Stabilization of N-compounds in soil and organic-matter-rich sediments – what is the difference? *Marine Chem.*, **92**, 167–195.
- Knicker, H., Hatcher, P. G. 1997. Survival of protein in an organic-rich sediment: possible protection by encapsulation in organic matter. *Naturwissenschaften*, **84**, 231–234.
- Knicker, H., Fründ, R., and Lüdemann, H.-D. 1993. The chemical nature of nitrogen in native soil organic matter. *Naturwissenschaften*, **80**, 219–221.
- Leinweber, P., Kruse, J., Walley, F. L., Gillespie, A., Eckhardt, K.-U., Blyth, R. I. R., and Regier, T. 2007. Nitrogen K-edge XANES – an overview of reference compounds used to identify ‘unknown’ organic nitrogen in environmental samples. *J. Synchrotron. Rad.*, **14**, 500–511.
- Leinweber, P., Schulten, H.-R. 2000. Nonhydrolyzable forms of soil organic nitrogen: Extractability and composition. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **163**, 433–439.
- Lobe, I., Amelung, W., and Du Preez, C. C. 2001. Losses of carbon and nitrogen with prolonged arable cropping from sandy soils of the South African Highveld. *Eur. J. Soil Sci.*, **52**, 93–101.
- Mahieu, N., Olk, D. C., and Randall, E. W. 2000. Accumulation of heterocyclic nitrogen in humified organic matter: a ^{15}N -NMR study of lowland rice soils. *Eur. J. Soil Sci.*, **51**, 379–389.

- Maie, N., Knicker, H., Watanabe, A., and Kimura, M. 2006. Heterocyclic N in the highly humified humic acids extracted from the subsoil of paddy fields and surface and soils. *Org. Geochem.*, **37**, 12–19.
- Maie, N., Scully, N. M., Pisani, O., and Jaffé, R. 2007. Composition of protein-like fluorophore of dissolved organic matter in coastal wetland and estuarine ecosystems. *Water Res.*, **41**, 563–570.
- Martens, D. A., Loeffelmann, K. L. 2003. Soil amino acid composition quantified by acid hydrolysis and anion chromatography-pulsed amperometry. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6521–6529.
- Mathers, N. J., Mao, X. A., Saffigna, P. G., Xu, Z. H., Berners-Price, S. J., and Perera, M. C. S. 2000. Recent advances in the application of ^{13}C and ^{15}N NMR spectroscopy to soil organic matter studies. *Aust. J. Soil Res.*, **38**, 769–787.
- Matsumoto, S., Ae, N., and Yamagata, M. 2000. The status and origin of available nitrogen in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, 139–149.
- McCarthy, M. D., Hedges, J. I., and Benner, R. 1998. Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen. *Science*, **281**, 231–234.
- Mengel, K. 1996. Turnover of nitrogen in soils and its availability to crops. *Plant and Soil*, **181**, 83–93.
- Mongenot, T., Riboulleau, A., Garcette-Lepecq, A., Derenne, D., Poueta, Y., Baudin, F., and Largeau, C. 2001. Occurrence of proteinaceous moieties in S- and O-rich Late Tithonian kerogen (Kashpir oil Shales, Russia). *Organ. Geochem.*, **32**, 199–203.
- Nagao, S., Matsushita, T., Suzuki, Y., Ueno, T., and Amano, H. 2003. Characteristics of humic substances in the Kuji river waters as determined by high-performance size chromatography with fluorescence detection. *Water Res.*, **37**, 4159–4170.
- Nunn, B. L., and Keil, R. G. 2005. Size distribution and chemistry of base-extractable proteins from Washington coast sediments. *Biogeochemistry*, **75**, 177–200.
- Piccolo, A. 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, **166**, 810–832.
- Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, R., and Chiarella, M. 2003. Effects of some dicarboxylic acids on the 5 association of dissolved humic substances. *Biol. Fertil. Soils*, **37**, 255–259.
- Piccolo, A., Nardi, S., and Concheri, G. 1996. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.*, **47**, 319–328.
- Quiquampoix, H., and Burns, R. G. 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements*, **3**, 401–406.
- Rillig, M. C., Caldwell, B. A., Wösten, H. A. B., and Sollins, P. 2007. Role of proteins in soil carbon and nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry*, **85**, 25–44.
- Schaumann, G. E. 2006. Soil organic matter beyond molecular structure. part I: macromolecular and supramolecular characteristics. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **169**, 145–146.
- Schmidt, M. W. I., Knicker, H., Hatcher, P. G., and Kögel-Knabner, I. 1997. Improvement of ^{13}C and ^{15}N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with 10% hydrofluoric acid. *Eur. J. Soil Sci.*, **48**, 319–328.
- Schmidt-Rohr, K., Mao, J. D., and Olk, D. C. 2004. Nitrogen-bonded aromatics in soil organic matter and their implications for a yield decline in intensive rice cropping. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 6351–6354.
- Schimel, J. P., and Bennett, J. 2004. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology*, **85**, 591–602.
- Senwo, Z. N., and Tabatabai, M. A. 1998. Amino acid composition of soil organic matter. *Biol. Fertil. Soils*, **26**, 235–242.
- Shulten, H.-R., and Schnitzer, M. 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol. Fertil. Soils*, **26**, 1–5.
- Simpson, A. J. 2002. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, **40**, S72–S82.
- Simpson, A. J., Song, G., Smith, E., Lam, B., Novotny, E. H., and Hayes, M. H. B. 2007. Unraveling the structural components of soil humin by use of solution-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 876–883.
- Smernik, R. J. 2005. Solid-state ^{13}C NMR spectroscopic studies of soil organic matter at two magnetic field strengths. *Geoderma*, **125**, 249–271.
- Smernik, R. J., and Baldock, J. A. 2005. Does solid-state ^{15}N NMR spectroscopy detect all soil organic nitrogen? *Biogeochemistry*, **75**, 507–528.
- Sowden, F. J., Chen, Y., and Schnitzer, M. 1977. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **41**, 1524–1526.
- Stevenson, F. J. 1982. Organic forms of soil nitrogen. In F. J. Stevenson (ed) Nitrogen in agricultural soils. *Agron.*, **22**, p. 67–114, ASA-CSSA-SSSA, Madison.
- Sutton, R., and Sposito, G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 9009–9015.
- Trubetskaya, O. E., Reznikova, O. I., Afanas'eva, L. F., Markova, L. F., Muranova, T. A., and Trubetskoj, O. A., 1998. Amino acid distribution in soil humic acids fractionated by tandem size exclusion chromatography polyacrylamide gel electrophoresis. *Environment International*, **24**, 573–581.
- Vairavamurthy, A., and Wang, S. 2002. Organic nitrogen in geomacromolecules: Insights on speciation and transformation with K-edge XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3050–3056.
- Voet D., and Voet, J. G. 1995. Biochemistry (2ed), John Wiley & Sons, Ltd., New York.
- 山本修一・吉岡秀佳・石渡良志 2007. 環境中のクロジェン及び腐植物質の熱分解及び化学分解ガスクロマトグラフィー/質量分析法と地球化学への応用. *分析化学*, **56**, 71–91.
- Yu, Z., Zhang, Q., Kraus, T. E. C., Dahlgren, R. A., Anastasio, C., and Zasoski, R. J. 2002. Contribution of amino compounds to dissolved organic nitrogen in forest soils. *Biogeochemistry*, **61**, 173–198.
- Zang, X., van Heemst, J. D. H., Dria, K. J., and Hatcher, P. G. 2000. Encapsulation of protein in humic acid from a histosol as an explanation for the occurrence of organic nitrogen in soil and sediment. *Org. Geochem.*, **31**, 679–695.