

(15) 二価金属存在下におけるクエン酸第二鉄錯体と Desferrioxamine Bのリガンド交換動力学

伊藤 紘晃^{1*}・藤井 学¹・佐々木 史織¹・T. David Waite²・大村 達夫¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

²ニューサウスウェールズ大学 土木環境工学科 (Sydney, NSW 2052, Australia)

* E-mail: itohiro@water.civil.tohoku.ac.jp

二価金属(CaとMg)存在下でのクエン酸第二鉄錯体(FeCit)とdesferrioxamine B (DFB)のリガンド交換反応について、(1)FeCitが解離した後DFBがFeと錯形成する経路(disjunctive経路)と、(2)DFBが直接FeCitに結合してFeDFBが形成される経路(adjunctive経路)を考慮した動力学モデルを構築した。disjunctive経路において、モデルは実測により求めた複合的な反応速度定数を良好に推定できた。一方、adjunctive経路では、反応速度定数がクエン酸や二価金属の濃度に依存したため、それらがFeCitへ直接的に付加する反応を新たにモデルに考慮することで、adjunctive経路におけるリガンド交換反応を説明することができた。

Key Words : iron-citrate complex, desferrioxamine B, ligand-exchange reaction, divalent cations

1. はじめに

鉄は、海洋性植物プランクトンの光合成や窒素固定等の生命活動の際に必要なとされる微量必須栄養素である¹。²。海水中における鉄の形態は、溶解性の無機第一鉄 Fe(II) (i.e., Fe^{2+} , $\text{Fe}(\text{OH})^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_2$)と無機第二鉄 Fe(III) (i.e., Fe^{3+} , FeOH^{2+} , $\text{Fe}(\text{OH})_3^0$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$)、不溶性の酸化水酸化鉄($\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$)、及び有機態の鉄($\text{Fe}(\text{II})\text{L}$ と $\text{Fe}(\text{III})\text{L}$)に分類される³。溶存酸素が十分に存在する海域や沿岸域の表層水において、第一鉄種($\text{Fe}(\text{II})$ と $\text{Fe}(\text{II})\text{L}$)はすぐさま第二鉄種($\text{Fe}(\text{III})$ と $\text{Fe}(\text{III})\text{L}$)に酸化されるため、鉄の多くは第二鉄種として存在する⁴。中性 pH において $\text{Fe}(\text{III})$ は、濃度が nM オーダー以上において熱力学的に不安定であり、第二鉄種のほとんどは $\text{Fe}(\text{III})\text{L}$ か沈殿物である $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ の形態で存在する⁵。

沿岸域では、陸域を起源とする自然由来有機物質 (Natural Organic Matter: NOM)が比較的高濃度で供給される。NOM は鉄に対して高い錯形成能を有するため、沿岸域における溶存鉄濃度は、nM から μM オーダーと、外洋 (pM から nM オーダー)より高い³。NOM と錯体を形成して存在する第二鉄($\text{Fe}(\text{III})\text{-NOM}$ 錯体)は、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ とは異なり化学的反応性に富むため、生物利用性が高いと考えられている⁶。しかしながら、NOM は不均一な構造

を有しており⁷、海洋性植物プランクトンが $\text{Fe}(\text{III})\text{-NOM}$ 錯体自体を直接摂取しているとは考えづらい⁸。植物プランクトンの鉄摂取方法としては、(1) $\text{Fe}(\text{III})$ と親和性の高いリガンドであるシデロフォアを産出し、藻類細胞外でのリガンド交換反応を経て形成された Fe シデロフォア錯体を摂取する方法^{9,10}、(2) スーパーオキシドや還元酵素などの還元剤を生産し、還元反応を経て生成された $\text{Fe}(\text{II})$ を細胞内に取り込む方法^{12,13}、(3) 解離した $\text{Fe}(\text{III})$ を直接摂取する方法が確認されている^{8,10}。シデロフォアによる鉄摂取方法は、鉄欠乏条件下において、多くのシアノバクテリアや一部の真核藻類に見られる^{9,10}。また、複数の海域で、有機鉄錯体の条件付安定度定数は、 Fe シデロフォア錯体と同程度であることが確認されており、 Fe シデロフォア錯体は遍在することが示唆されている¹¹。このような Fe シデロフォア錯体は、初期の有機鉄錯体(e.g., $\text{Fe}(\text{III})\text{-NOM}$ 錯体)とシデロフォアのリガンド交換反応を介して形成されると考えられる。

リガンド交換反応の動力学を調べる手法として競合リガンド法がある^{11,15,19}。この手法では、初期の有機リガンドと錯形成していた Fe が別種のリガンド(競合リガンドと呼ばれ、本研究ではシデロフォアである desferrioxamine B に相当する)に交換される反応の速度を分光光度法や電気化学的手法により測定する。リガンド

交換反応には、初期の有機錯体から金属イオンが解離し、その遊離金属イオンと競合リガンドが結合する経路 (disjunctive 経路)と、競合リガンドが直接的に初期の有機錯体と結合し、錯体を解離させる経路 (adjunctive 経路) が存在する^{20,21)}。リガンド交換反応の速度は、disjunctive と adjunctive 両経路により影響を受ける。

沿岸水や海水中には、Ca や Mg などの二価金属イオンが高濃度で存在する。二価金属はフリーなリガンドと結合し、また、有機金属錯体に直接的に作用するため、結果としてリガンド交換反応速度を大きく変化させる²²⁻²⁴⁾。しかし、disjunctive 及び adjunctive 両経路を考慮した上で、リガンド交換機構に及ぼす二価金属の影響を定量的に評価した研究例は、著者らの知る限りこれまでにない。また、リガンド交換反応の研究は、主として Fe 以外の金属を対象として行っており、Fe のリガンド交換反応に関する情報が少ないのが現状である。有機鉄錯体のリガンド交換機構を詳細に調べることは、実海域や沿岸域における鉄の錯化動力学や生物利用性のより詳しい理解に繋がる。

以上の背景から、本研究では、二価金属イオン(Ca, Mg)存在下で、有機鉄錯体のリガンド交換機構を調べ、その動力学モデルを構築した。初期の有機鉄錯体を形成するリガンドとして、クエン酸(Cit)を使用した。Cit は、NOM と比較して簡明な構造を成しているため、沿岸域での有機鉄の挙動を調べる研究に使用される代表的なモデルリガンドである^{6,15)}。競合リガンドとしては、菌類由来シデロフォアである desferrioxamine B (DFB)を用いた。FeDFB 錯体は特定波長(429 nm)で吸光を示すため²⁵⁾、分光光度法によりその錯体濃度の時間変化を測定することで、リガンド交換反応の動力学を調べることができる。また、DFB は分子量や Fe との結合性に関して、海洋性植物プランクトン由来のシデロフォアと近い特徴を示すことが知られている^{11,26)}。

2. 実験方法

(1) 試薬およびストック溶液の作成

1.0 g/L 硝酸第二鉄溶液 ($\text{HNO}_3=0.2\text{M}$, 和光純薬工業)を精製水(AQUA PURIFICATE, 大和薬品)で希釈し、0.5 mM Fe(III)ストック溶液を作成した。クエン酸ナトリウム二水和物(関東化学)を精製水に溶解させることで、0.1 M Cit ストック溶液を作成した。Desferrioxamine mesylate salt (Sigma)を精製水に溶解させ、25 mM DFB ストック溶液を作成した。Cit および DFB ストックをサンプル溶液に加える際に、サンプル溶液の pH が変化するのを避けるため、両ストック溶液の pH を 8.0 に調整した。Cit と

Fe(III)の錯体(FeCit 錯体)溶液を準備する際に用いるバッファーとして、0.2 M 重炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3 , 関東化学)溶液(pH 8)を精製水中に用意した。

塩化ナトリウム(NaCl , 関東化学)及び重炭酸ナトリウム(NaHCO_3)を、 NaCl 濃度が 0.5 M、 NaHCO_3 濃度が 2 mM となるよう精製水に加え、 $\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液を作成した。塩化カルシウム二水和物($\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 関東化学)および塩化マグネシウム六水和物($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 関東化学)を $\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液中に溶解させ、1 M Ca および Mg ストック溶液を作成した。以上の $\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液と Ca および Mg ストック溶液の pH を 8.0 に調整した。

以上の試薬、ストック溶液は、使用時以外 4 °C の暗室に保存した。本実験に使用した全てのガラス容器は、分析前に 0.1 M 塩酸により洗浄した。pH の調整には、HM-20 pH メーター(TOK DKK)を使用した。pH の調整には、Milli-Q により希釈した 0.1, 0.5, 1, 5 M 塩酸または水酸化ナトリウム溶液(関東化学)を使用した。実験はすべて 25 °C の恒温室で行った。

(2) FeDFB 錯体濃度の測定

10 cm セル分光器システム(Ocean Optics)を用い、波長 429 nm において FeDFB 錯体濃度を nM オーダーで測定した²⁵⁾。分光器システムは、光源である重水素タングステンハロゲンランプ(DH-2000, 波長範囲: 200 nm-2000 nm)、分光光度計 (USB 2000 UV-VIS, 測定可能波長: 200 nm-850 nm)、石英シリンジキュベット(容量: 25 mL)及びキュベットホルダー(CUV-UV-10)から構成される。また、モニタリングプログラムとして OOIBase 32 を使用した。安定した吸光度を得るため、750 nm における吸光度を用いてベースライン補正を行った。

$\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液中における FeDFB 錯体のモル吸光度は $\epsilon_{429} = 2,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、既往の文献値と同程度を示した($\epsilon_{429} = 2,280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁵⁾)。

(3) リガンド交換反応速度の測定

1.5 mL ポリプロピレンチューブ内で、0.5 mM Fe ストック溶液 50 μL と適量の Cit ストック溶液(125-1,250 μL)を混合した後、0.2 M NaHCO_3 バッファー溶液 250 μL を添加し、25 °C の暗条件で 1 日置き平衡化させ、FeCit 錯体のストック溶液を用意した。1 atm における飽和溶存酸素濃度は 0.24 mM であり、この条件下においては、クエン酸第一鉄は酸化され、クエン酸第二鉄として存在する²⁷⁾。従って、本研究で用いたクエン酸鉄錯体はクエン酸第二鉄錯体のみと考えられる。

FeCit 錯体を Fe 濃度が 1 μM 、Cit 濃度が 0.5 mM から 5 mM となるように $\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液に添加し、サンプル溶液とした。このサンプル溶液を 10 cm シリンジキュベ

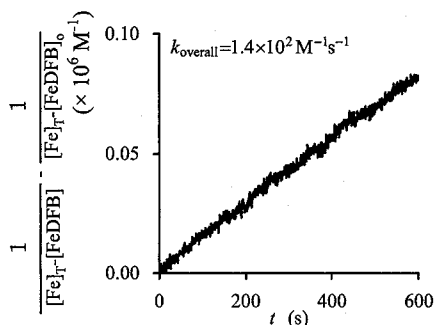


図-1 k_{overall} の算出. NaCl/NaHCO₃ 溶液中での実験結果である. ([Cit]_T = 1 mM, [Fe]_T = 1 μ M, [DFB]_T = 1 μ M). 縦軸に式 7 の左辺を, 横軸に時間 t をとり, その傾きを k_{overall} として得た.

ットに移し, 吸光度をゼロに設定した後, DFB ストック溶液を DFB 濃度が 1 μ M となるよう添加した. その後 10 分間, 波長 429 nm における吸光度を観測し, DFB 錯体の生成速度 (i.e., DFB によるリガンド交換反応速度) を測定した.

二価金属イオンを含む条件での実験では, NaCl/NaHCO₃ 溶液に Ca ストック溶液, あるいは Mg ストック溶液を, Ca または Mg 濃度が 1 mM から 50 mM となるように添加した (それぞれ Ca 溶液, Mg 溶液と呼ぶ). NaCl/NaHCO₃ 溶液の代わりに, この Ca 溶液及び Mg 溶液を用いて, 上記と同様のサンプル溶液を作成し, サンプル溶液に DFB を添加した後, DFB によるリガンド交換反応速度を測定した. 本実験条件下において, DFB の分解²⁰⁾等による反応速度への影響は見られなかった.

(4) データ解析

FeCit 錯体が存在する溶液に DFB を加え, FeDFB 錯体が生成される全反応は, 以下のように表すことができる.



ここで, k_{overall} は反応全体に対応する速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) を表す. DFB と Fe との親和性は高く ($\log K_{\text{FeDFB}} = 12.1 \pm 0.6$ M^{-1} ¹¹⁾), FeDFB はほとんど解離しないので, 式 1 の逆反応は無視できる. この反応速度式は次のように表される.

$$\frac{d[\text{FeDFB}]}{dt} = k_{\text{overall}} [\text{FeCit}] [\text{DFB}] \quad (2)$$

Fe 濃度は極めて低いので, $[\text{FeCit}] \approx [\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}]$, $[\text{DFB}] \approx [\text{DFB}]_T - [\text{FeDFB}]$ と近似できる. さらに, いずれの実験条件においても $[\text{Fe}]_T \approx [\text{DFB}]_T (= 1 \mu\text{M})$ であったから,

$$\frac{d[\text{FeDFB}]}{dt} = k_{\text{overall}} ([\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}])^2 \quad (3)$$

式 3 について, 積分すると,

$$\int \frac{1}{([\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}])^2} d[\text{FeDFB}] = k_{\text{overall}} \int dt \quad (4)$$

$$\frac{1}{[\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}]} = k_{\text{overall}} t + C \quad (5)$$

$t = 0$ にて $[\text{FeDFB}] = [\text{FeDFB}]_0$ とおくと,

$$C = \frac{1}{[\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}]_0} \quad (6)$$

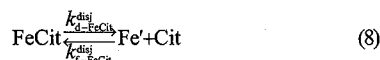
$$\therefore \frac{1}{[\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}]} - \frac{1}{[\text{Fe}]_T - [\text{FeDFB}]_0} = k_{\text{overall}} t \quad (7)$$

時間変化に伴う FeDFB の濃度変化を観測し, 式 7 の左辺と時間 t (s) の散布図を描き, 回帰直線の傾きを求めることにより k_{overall} を得た (図-1).

3. 結果と考察

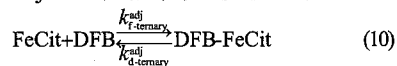
(1) 二価金属が存在しない系でのリガンド交換反応

disjunctive 経路と adjunctive 経路を考慮した従来のリガンド交換動力学モデルによれば^{20, 21)}, 本研究におけるリガンド交換反応は以下のように表現できる. Fe が初期の錯体から解離し, DFB と結合する経路 (disjunctive 経路) において, FeDFB の生成反応は, 次の反応式で表される.



ここで, Fe' は溶解性の無機第二鉄 (i.e., Fe(III)'), $k_{\text{d-FeCit}}$ は disjunctive 経路における FeCit の解離速度定数 (s^{-1}), $k_{\text{f-FeCit}}$ は Fe' と Cit の錯形成速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), $k_{\text{f-FeDFB}}$ は Fe' と DFB の錯形成速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) を表す.

一方, FeDFB の生成には, Fe が初期の錯体から解離せずに, 直接 DFB が錯体と結合し, 3 元錯体 (DFB-FeCit) を形成した後, FeDFB を生成する経路 (adjunctive 経路) も存在する. adjunctive 経路は, 次の反応式で表される.



ここで, $k_{\text{f-ternary}}$ は FeCit と DFB の反応による 3 元錯体の生成速度定数 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), $k_{\text{d-ternary}}$ は 3 元錯体が FeCit と DFB に解離する速度定数 (s^{-1}), $k_{\text{f-FeDFB}}$ は 3 元錯体が Cit と FeDFB に解離する速度定数 (s^{-1}) である.

Fe' は, Cit や DFB とすぐさま錯形成する (速度定数は 10^5 から 10^6 オーダー^{15, 20)}). DFB-FeCit も, FeCit と DFB から FeDFB が形成される反応での中間体であるため, その反応性は高いと考えられる. 従って, 式 8 と 9 および

表-1 モデル推定値 $k_{\text{slope-app}}^{\text{disj}}$ の算出のために用いた、反応速度定数と安定度定数。LはCitまたはDFBを表す。

ligand	$k_{\text{d-FeL}}^{\text{disj}} \times 10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{f-FeL}}^{\text{disj}} \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\log K_{\text{CaL}}$	$k_{\text{f-Ca}}^{\text{disj}} \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$\log K_{\text{MgL}}$	$k_{\text{f-Mg}}^{\text{disj}} \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Cit	$1.2 \pm 0.1^{\text{a}}$	2.1^{b}	1.8^{c}	0.24^{b}	2.5^{b}	0.38^{b}
DFB	-	16^{d}	-	16^{d}	-	16^{d}

a) 本研究において、Meが存在しない系での実験により決定された速度定数、b) Fujii (2007)²⁹、c) Pham (2006)³⁰、d) NaCl/NaHCO₃溶液中と海水中におけるDFBとFeの錯形成速度定数の差が微小であることから、 $k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} = k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} = k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj-Mg}}$ を仮定した。

式 10 と 11 で示す連続化学反応において、中間生成物である Fe' や DFB-FeCit は、反応物や生成物に比べて無視できるほどの濃度レベルにしか蓄積されないと考えられる。以上の理由から、反応中間体である Fe' と DFB-FeCit について定常状態を仮定することで、disjunctive 経路および adjunctive 経路における FeDFB の生成速度定数 $k_{\text{disj}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ 及び $k_{\text{adj}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ を以下のように導くことができる (付録 1 と 2 参照)。

$$k_{\text{disj}} = \frac{k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}}}{k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}] + k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}]} \quad (12)$$

$$k_{\text{adj}} = \frac{k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}}}{k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj}} + k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}}} \quad (13)$$

全 Cit 濃度 $[\text{Cit}]_{\text{T}}$ が全 Fe 濃度 $[\text{Fe}]_{\text{T}}$ より十分に大きい場合 (i.e., $[\text{Cit}]_{\text{T}} \gg [\text{Fe}]_{\text{T}}$)、FeCit の解離に伴う $[\text{Cit}]$ の時間変化は無視できる (i.e., $[\text{Cit}] \approx [\text{Cit}]_{\text{T}}$)。従って、 $[\text{Cit}]_{\text{T}} \gg [\text{Fe}]_{\text{T}}$ が成り立ち、かつ $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \gg k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}]_{\text{T}}$ が成り立つように実験条件を定めることで、 k_{disj} は、

$$k_{\text{disj}} \approx \frac{k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}}}{k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}}} \frac{1}{[\text{Cit}]_{\text{T}}} = k_{\text{slope}}^{\text{disj}} \frac{1}{[\text{Cit}]_{\text{T}}} \quad (14)$$

と近似できる。ここで、 $k_{\text{slope}}^{\text{disj}} = k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} / k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}}$ 。

また、disjunctive と adjunctive 経路における反応は独立して起こるので、全反応の速度定数である k_{overall} は、両経路における速度定数の和で表される。

$$k_{\text{overall}} = k_{\text{disj}} + k_{\text{adj}} \approx k_{\text{slope}}^{\text{disj}} \frac{1}{[\text{Cit}]_{\text{T}}} + k_{\text{adj}} \quad (15)$$

k_{overall} は、 $1/[\text{Cit}]_{\text{T}}$ について傾き $k_{\text{slope}}^{\text{disj}}$ 、切片 k_{adj} の線形一次方程式で表される。

図-2 に示すように、NaCl/NaHCO₃ 溶液中において様々な $[\text{Cit}]_{\text{T}}$ で測定された k_{overall} を縦軸に、 $1/[\text{Cit}]_{\text{T}}$ を横軸にとると、それらには有意な正の線形関係 ($R^2 = 0.96$) が得られた。この直線の傾きと切片から、式 15 で表される $k_{\text{slope}}^{\text{disj}}$ と k_{adj} は、それぞれ $0.10 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ 、 $18 \pm 7 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ と算出された。既往の研究から、pH 8 の NaCl 溶液中における錯形成速度定数について $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Fujii et al., 2007)²⁹、 $k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} = 1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Pham et al., 2006)³⁰ と報告されている (表-1)。従って、 $k_{\text{slope}}^{\text{disj}} = k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} / k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}}$ に、

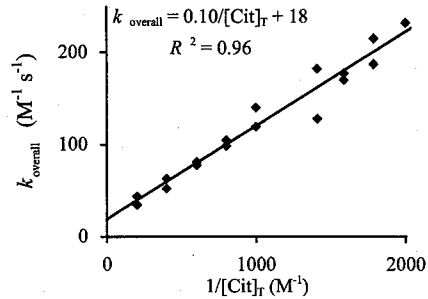


図-2 NaCl/NaHCO₃ 溶液中での k_{overall} と $1/[\text{Cit}]_{\text{T}}$ の関係。点は測定値、実線はモデルの適合 (式 15) を表す。

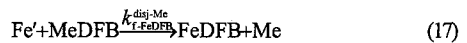
$k_{\text{slope}}^{\text{disj}}$ と $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}}$ 、 $k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}}$ の値を代入することで、 $k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj}}$ は $1.2 (\pm 0.1) \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ と決定された。

一方で、式 14 と 15 における近似は、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \gg k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}]_{\text{T}}$ のときのみ成り立つ。実験条件と表-1 に示した速度定数を用いて、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}]_{\text{T}} = 2.1 \times 10^5 \times (0.5 \sim 5 \times 10^{-3}) = 1.1 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、 $k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}]_{\text{T}} = 1.6 \times 10^6 \times (1 \times 10^{-6}) = 1.6 \text{ s}^{-1}$ と計算される。従って、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \gg k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}]_{\text{T}}$ が成り立ち、式 14 と 15 における近似の妥当性が示された。

(2) 二価金属存在下でのリガンド交換反応

a) 動力学モデル

Ca や Mg などの競合金属イオン (Me) が存在すると、Me は Cit や DFB 双方と錯体を形成し、disjunctive 経路における FeCit と FeDFB の錯形成反応に影響を及ぼす可能性がある。また、Me の作用により FeCit の解離が促進することも予想される。disjunctive 経路において、Me が関与する FeCit の解離・生成反応 (式 16)、Me が関与する FeDFB の生成反応 (式 17) は、以下の式で表される。



ここで、 $k_{\text{d-FeCit}}^{\text{disj-Me}}$ は Me の作用により FeCit が解離する反応の速度定数 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj-Me}}$ は Fe' と MeCit から FeCit が生成される反応の速度定数 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)、 $k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj-Me}}$ は Fe' と MeDFB から FeDFB が生成される反応の速度定数 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) を表す。

Fe' と Cit および Fe' と MeCit からの FeCit 形成反応は、それぞれ独立して起こることを考慮すると、Cit と MeCit が混在する系における FeCit の生成速度定数 ($k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj-app}} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$) は、次式のように表せる。

$$[\text{Cit}] k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj-app}} = [\text{Cit}] k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} + [\text{MeCit}] k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj-Me}} \quad (18)$$

ここで、MeCit は Me と錯形成した Cit、Cit は Fe と錯形

成していない Cit, Cit は金属と錯形成していないフリーな Cit を示す。FeCit の生成速度定数は, Me の存在により, 金属交換反応の必要性から, 1 オーダー程度減少する。Fe と Cit についての反応速度定数は $k_{f-FeCit}^{disj} = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり, 一方, Fe と MeCit についての反応速度定数は, Ca の場合 $k_{f-FeCit}^{disj-Ca} = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Mg の場合 $k_{f-FeCit}^{disj-Mg} = 3.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ である(表-1, Fujii et al., 2007²⁹)。

Me 存在下での FeDFB の生成についても, Cit と同様に, 以下の式が成り立つ。

$$[DFB']k_{f-FeDFB}^{disj-app} = [DFB]k_{f-FeDFB}^{disj} + [MeDFB]k_{f-FeDFB}^{disj-Me} \quad (19)$$

ここで, MeDFB, DFB', DFB は, それぞれ Me と錯形成した DFB, Fe と錯形成していない DFB, フリーな DFB を示し, $k_{f-FeDFB}^{disj-app}$ は, Me 存在下での FeDFB の生成速度定数を表す。FeDFB の生成について, 二価金属イオンを多量に含む海水中の速度定数は, $2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Hudson et al., 1992²⁰)であり, Me が存在しない系 ($1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) とほぼ等価な値が得られている。これは, DFB は Fe と特に高い親和性を有し, DFB が Me と錯形成していても, フリーなリガンドと同程度で金属交換反応が行われるためと考えられる。従って, Me が存在する系としない系において, FeDFB の生成速度定数は一定と仮定した (i.e., $k_{f-FeDFB}^{disj} = k_{f-FeDFB}^{disj-Ca} = k_{f-FeDFB}^{disj-Mg} = 1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。これにより, 式 19 は, 以下のように近似できる。

$$[DFB']k_{f-FeDFB}^{disj-app} \approx [DFB']k_{f-FeDFB}^{disj} \quad (20)$$

FeCit の解離速度定数に関して, Cit は Me との親和性よりも Fe との親和性の方が非常に高いので, Me の直接的な作用による FeCit 錯体解離速度の上昇は微小であると考えられる。従って, Me 存在下での FeCit の解離反応速度定数 ($k_{d-FeCit}^{disj-app}$) について以下のような近似が成り立つと仮定した。

$$k_{d-FeCit}^{disj-app} = k_{d-FeCit}^{disj} + k_{d-FeCit}^{disj-Me} [Me] \approx k_{d-FeCit}^{disj} \quad (21)$$

以上から, Me が存在すると, Fe と MeCit との反応による FeCit 錯体の生成速度が Fe と Cit のそれと比較して低くなるため, 結果としてリガンド交換反応速度が変化すると考えられる²⁰。すなわち, Me 存在下において, disjunctive 経路についての速度定数は, 従来の反応系(式 8~11)に, 式 16 における逆反応を新たに考慮することで表記できると考えられる(図-3)。従って, Me 存在下において, disjunctive 経路により説明される速度定数 $k_{disj}^{app} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ は, 次式で表される。

$$k_{disj}^{app} = \frac{k_{d-FeCit}^{disj-app} k_{f-FeDFB}^{disj-app}}{k_{f-FeCit}^{disj-app} [Cit] + k_{f-FeDFB}^{disj-app} [DFB']} \approx \frac{k_{d-FeCit}^{disj} k_{f-FeDFB}^{disj}}{k_{f-FeCit}^{disj} [Cit] + k_{f-FeDFB}^{disj} [DFB']} \quad (22)$$

式 22 は, 中間生成物 Fe' について定常状態を仮定することでも算出可能であり, その導出方法を付録 3 に示した。

一方, adjunctive 経路により説明される速度定数 $k_{adj}^{app} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ について, DFB と Fe の親和性が高いことから, DFB-FeCit の形成速度は Me の存在には影響を受けないと予想される。従って, adjunctive 経路により説明される速度定数 $k_{adj}^{app} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ は, Me の影響を考慮した場合としない場合において等しいと仮定した。

$$k_{adj}^{app} \approx k_{adj} \quad (23)$$

ここで, k_{adj} は Me が存在しない系で既に求められている (i.e., $k_{adj} = 18 \pm 7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。

Me が存在しない系と同様に, $[Cit]_T \gg [Fe]_T$ (i.e., $[Cit] \approx [Cit]_T$), および $k_{f-FeCit}^{disj} [Cit]_T \gg k_{f-FeDFB}^{disj} [DFB]_T$ が成り立つように実験条件を定めることで, k_{disj}^{app} は,

$$k_{disj}^{app} \approx \frac{k_{d-FeCit}^{disj} k_{f-FeDFB}^{disj}}{k_{f-FeCit}^{disj} [Cit]_T} \left(1 - \frac{k_{d-FeCit}^{disj} k_{f-FeDFB}^{disj}}{k_{f-FeCit}^{disj} [Cit]_T + k_{f-FeDFB}^{disj} [MeCit]} \right) \quad (24)$$

と近似される。ここで,

$$k_{slope}^{disj-app} = \frac{k_{d-FeCit}^{disj} k_{f-FeDFB}^{disj}}{k_{f-FeCit}^{disj}} \quad (25)$$

とする。 $k_{overall}$ は,

$$k_{overall} = k_{disj}^{app} + k_{adj}^{app} \approx k_{slope}^{disj-app} \frac{1}{[Cit]_T} + k_{adj}^{app} \quad (26)$$

と表され, $k_{overall}$ は, $1/[Cit]_T$ について傾き $k_{slope}^{disj-app}$, 切片 k_{adj}^{app} の線形一次方程式で表される。

disjunctive 経路における速度定数に含まれる $k_{f-FeDFB}^{disj-app}$ を計算するためには, $[Cit]$ および $[MeCit]$ を算出する必要がある。Cit と Me についての平衡式は, 次式で表される。

$$Cit + Me \rightleftharpoons MeCit, K_{MeCit} = \frac{[MeCit]}{[Cit][Me]} \quad (27)$$

ここで, K_{MeCit} は MeCit の安定度定数であり, 既往の研究²⁹から, $\log K_{CaCit} = 1.8 \text{ M}^{-1}$, $\log K_{MgCit} = 2.5 \text{ M}^{-1}$ と算出されている(表-1)。実験条件を $[Cit]_T \gg [Fe]_T$ とすることにより, $[Cit]$ と $[MeCit]$ について, 以下の近似が成り立つ。

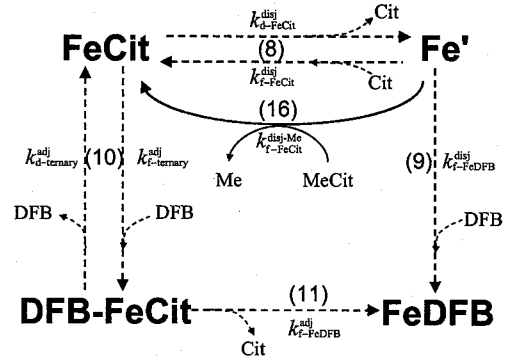


図3 Me 存在下でのリガンド交換動力学モデル。従来の反応を破線で, 本研究にて新たに加えた反応を実線で表した。括弧付き番号は本文中の式番号に対応する。

$$[\text{Cit}]_T \approx [\text{Cit}]_f + [\text{Cit}]_f + [\text{MeCit}] \quad (28)$$

また、実験条件を $[\text{Me}]_T \gg [\text{DFB}]_T$ ($2[\text{MeDFB}]$) とすれば、 $[\text{Me}]$ と $[\text{MeCit}]$ について次の近似が成り立つ。

$$[\text{Me}]_T \approx [\text{Me}]_f + [\text{MeCit}] \quad (29)$$

よって、式 27-29 から、 $[\text{MeCit}]$ が次のように導かれる。

$$[\text{MeCit}] = \frac{[\text{Cit}]_f + [\text{Me}]_f + \frac{1}{K_{\text{MeCit}}} - \left(\left([\text{Cit}]_f + [\text{Me}]_f + \frac{1}{K_{\text{MeCit}}} \right)^2 - 4[\text{Cit}]_f[\text{Me}]_f \right)^{1/2}}{2} \quad (30)$$

$[\text{MeCit}]$ が既知の時、 $[\text{Cit}]$ は式 28 から算出可能である。

b) disjunctive 経路におけるリガンド交換反応

Me 存在下において、disjunctive 経路におけるリガンド交換反応速度定数を、(1) 縦軸に実験により測定した k_{overall} を、横軸に $1/[\text{Cit}]_T$ をプロットし、式 26 を適合させて算出する方法、(2) リガンド交換反応に関わる各素反応の反応速度定数と安定度定数(表-1)を用いて、式 25 より算出する方法、の二つの方法を用いて算出した。以降、方法(1)と方法(2)で算出された反応速度定数を、それぞれ測定値($k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$)とモデル推定値($k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$)と定める。式 24 で示すように、 $k_{\text{disj}}^{\text{app}}$ と $k_{\text{disj-m}}^{\text{app}}$ そのものは $[\text{Cit}]_T$ の関数であるので、 $[\text{Cit}]_T$ に依存しない $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ 、 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ を比較する方が容易となる。従って、測定値 $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ とモデル推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ の比較により、disjunctive 経路における動力学モデルの妥当性を検証し、FeCit のリガンド交換機構に及ぼす二価金属の影響を調べた。

方法(1)より、各 Me 濃度において k_{overall} と $1/[\text{Cit}]_T$ をプロットし、式 26 を用いて、回帰直線の傾きと切片から $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ および $k_{\text{disj}}^{\text{app}}$ を決定した。一方で、方法(2)より、表-1 の各定数を式 25 に適用することで、モデル推定値として $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ を算出した。以上より、各 Me 濃度において算出された $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ と $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ の値を表-2 に示した。

Ca 溶液について測定値とモデル推定値を比較すると、図-4a に示すようにモデル推定値と測定値はよく適合した。従って、モデルは disjunctive 経路におけるリガンド交換反応を比較的よく表すことができているといえる。モデル(式 25)において disjunctive 経路での反応速度を支配する因子について見てみると、50 mM Ca の存在下で、FeCit の形成速度定数は $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj-app}} = \sim 0.94 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Fujii et al, 2007)²⁹⁾ であり、一方、Me が存在しない系の速度定数は $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ である。両者の比較から、Ca により FeCit 生成速度が約 1/2 に減少したことが分かる。これはすなわち、disjunctive 経路の反応速度を約 2 倍上昇させたことに相当する。従って、 $[\text{Ca}]$ 増加に伴う $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ の上昇は、Ca が Cit と錯形成し FeCit 生成速度を低下させることで生じたといえる。

Mg 溶液については、Mg 濃度上昇に伴い、測定値 $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ とモデル推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ は共に上昇傾向を示したが、測定値の上昇はモデル推定値よりも 1 オーダー程度大き

表-2 各 Me 濃度における測定値 $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ 、 $k_{\text{disj}}^{\text{app}}$ およびモデル

Me	log[Me] M	推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$		$k_{\text{disj}}^{\text{app}}$		R^2 a)	$k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ b)
		$k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ s^{-1}	SD a) s^{-1}	$k_{\text{disj}}^{\text{app}}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	SD a) $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$		
Ca	-3.0	0.07	0.01	0.08	0.01	0.93	0.10
	-2.0	0.11	0.01	0.15	0.01	0.89	0.15
	-1.6	0.14	0.04	0.26	0.05	0.59	0.22
	-1.3	0.26	0.04	0.27	0.05	0.85	0.30
Mg	-3.0	0.29	0.03	-0.02	0.04	0.92	0.12
	-2.0	1.75	0.20	-0.22	0.25	0.91	0.26
	-1.6	4.55	0.22	0.19	0.28	0.98	0.36
	-1.3	6.31	0.36	-0.39	0.46	0.98	0.43

a) SD は標準偏差、 R^2 は相関係数を表す、b) 表 1 の定数を用いた式 25 による推定値。

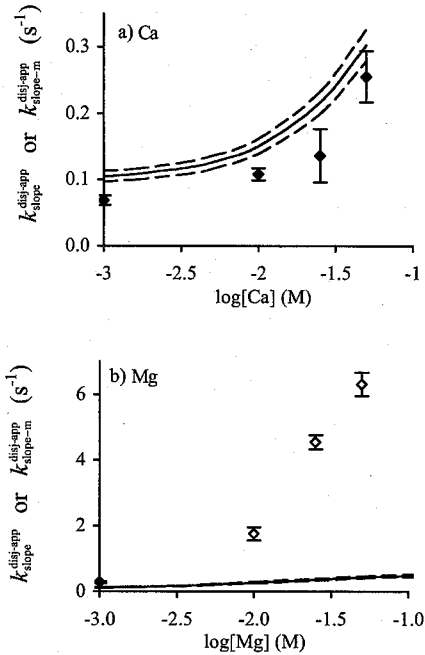


図-4 Me 濃度と disjunctive 経路における速度定数の測定値 $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ 及びモデル推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ の関係。a, b はそれぞれ Ca, Mg が存在する系での結果である。点は測定値 $k_{\text{slope}}^{\text{disj-app}}$ 、実線と破線はモデル推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ とその誤差範囲を表す。Mg の測定値について、 k_{overall} と $1/[\text{Cit}]_T$ の間に線形性が見られたものは◆で、線形性が見られなかったものは◇で示した。

かった(図-4b)。このような disjunctive 経路における測定値及びモデル推定値の相違に加えて、高濃度の Mg 存在下では adjunctive 経路における速度定数 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ が有意に負の値を示した(表-2)。このようなケースでは、図-5 で見られるように、 k_{overall} と $1/[\text{Cit}]_T$ の関係が非線形であった。

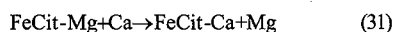
Ca 溶液中においては、disjunctive 経路におけるモデル

推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ は測定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ をよく再現することができた。従って、Mg 溶液において、モデル推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ と測定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ が異なり、式 26 の線形モデルが成立しなかった原因は、adjunctive 経路において、モデルでは考慮しなかった反応が、実際のリガンド交換反応には含まれていたためと考えられる。以上の理由から、disjunctive 経路におけるモデル推定値 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ は正しいと仮定し、以降の adjunctive 経路における考察を行った。

c) adjunctive 経路におけるリガンド交換反応

式23で示される adjunctive 経路の反応速度定数 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ ($\approx 18 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) は、少なくとも Mg については有効でないと考えられる。そこで、各 Cit 及び Me 濃度において実験により得られた k_{overall} から、モデルより推定される $k_{\text{disj-m}}^{\text{app}}$ を減じたものを、改めて adjunctive 経路についてのモデル推定値 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ として求めた。図-6に、様々な Cit 及び Me 濃度における $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ の値を示した。比較のため、図-6には、各 Me 濃度において k_{overall} と $1/[\text{Cit}]_{\text{f}}$ をプロットし、切片として得られた測定値 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ (表-2) も示した。モデル推定値 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ は、 $[\text{Ca}]$ 及び $[\text{Mg}]$ の増加に伴い増加し、Me 濃度依存性を示すことが明らかとなった。Ca の場合、 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ と $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ は一致する傾向を示したが、Mg の場合では、 $[\text{Me}]$ の増加に伴い $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ が 10^3 オーダーで急増し、測定値 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ とは大きく異なった。さらに、Mg の場合では、各 Cit 濃度における $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ の増加傾向が異なることから、 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ の Cit 濃度依存性も示された。以上から、adjunctive 経路の速度定数は、Cit や Me 濃度に依存するため、モデル修正の必要性が明らかとなった。

モデルから推定される disjunctive 経路の速度定数 $k_{\text{slope-m}}^{\text{disj-app}}$ (または $k_{\text{slope-m}}^{\text{app}}$) が正しいとすると、Mg が高濃度の場合、リガンド交換反応において adjunctive 経路が卓越する。このように、adjunctive 経路が優位であると考えられる高濃度の Mg 存在下において、FeCit と DFB 間でリガンド交換反応が進行している溶液サンプル ($[\text{Mg}]_{\text{f}} = 50 \text{ mM}$, $[\text{Cit}]_{\text{f}} = 1 \text{ mM}$, $[\text{DFB}]_{\text{f}} = [\text{Fe}]_{\text{f}} = 1 \text{ }\mu\text{M}$) を用意した。この溶液に、Ca を 10 mM 添加し、Ca 添加前後における k_{overall} の変化を調べた。その結果、興味深いことに k_{overall} は、Ca 添加前後において $2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $0.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ に減少した (図-7)。このような、Ca によるリガンド交換反応の抑制効果は、disjunctive 経路からは説明がつかない。一方、adjunctive 経路において、以下の式に示すように、Mg と Ca が FeCit との 3 元錯体 (FeCit-Me) 形成に関して競合関係にあったと考えれば、 k_{overall} の減少を合理的に説明できる。



Ca を添加することで、上式のように FeCit-Mg からすぐさま FeCit-Ca を形成し、かつ、DFB との反応に関して、FeCit-Ca は FeCit-Mg よりも反応速度が小さかったため、Ca の添加により k_{overall} が減少した、と考えることができ

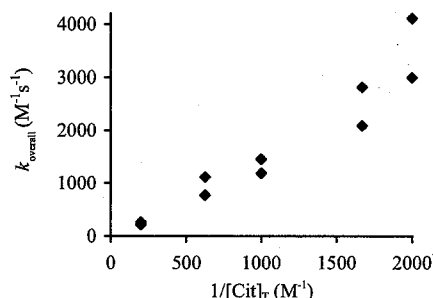


図-5 Mg 濃度 10 mM における k_{overall} と $1/[\text{Cit}]_{\text{f}}$ の関係

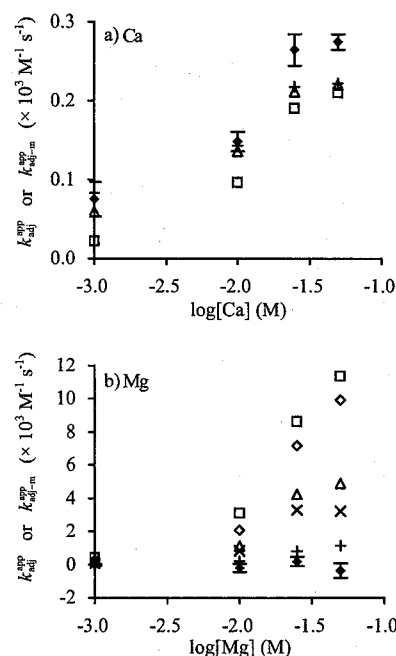
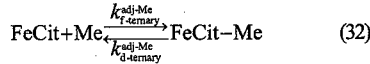


図-6 adjunctive 経路における反応速度定数の測定値 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ およびモデル推定値 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$. a, b はそれぞれ Ca, Mg についての結果である。◆は測定値 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ を、+, ×, △, ◇, □ はそれぞれ $[\text{Cit}]_{\text{f}} = 5 \text{ mM}$, 1.6 mM , 1 mM , 0.6 mM , 0.5 mM でのモデル推定値 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ を表す。

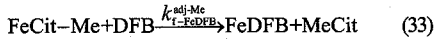
る。一方で、FeCit に Mg が付加し、3 元錯体を形成することで、FeDFB の生成が促進される現象は、adjunctive 経路において Mg が“触媒的”に作用するとも表現することができる。3 元錯体が生じたリガンド交換反応を活性化させる例として、Birus et al. (1998)³¹⁾ は、シュウ酸が FeDFB と 3 元錯体を形成し、EDTA とのリガンド交換反応を促進させることを報告している。

FeCit に Me が付加することで 3 元錯体の FeCit-Me が形

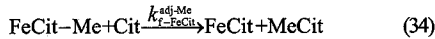
成される反応は、以下のように表せる。



ここで、 $k_{\text{f-ternary}}^{\text{adj-Me}}$ は FeCit-Me 形成についての速度定数($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、 $k_{\text{d-ternary}}^{\text{adj-Me}}$ は FeCit-Me の解離についての速度定数(s^{-1})を示す。続いて、DFB が FeCit-Me 錯体に付加することで、FeDFB が形成されると考えられる。



$k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}}$ は FeCit-Me への DFB 付加による FeDFB の形成反応についての速度定数($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)である。一方で、Cit と DFB は競合するものと考えられる。FeCit-Me 錯体への Cit の付加により FeCit が形成される反応は、次式で表される。



ここで、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}}$ は FeCit-Me への Cit 付加による FeCit の形成反応についての速度定数($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)である。

3元錯体 FeCit-Me を、FeDFB の形成反応における中間体ととらえ、FeCit-Me について定常状態を仮定すると、adjunctive 経路において Me が関与する反応の速度定数 $k_{\text{adj}}^{\text{Me}}$ は次のように表すことができる(付録4参照)。

$$k_{\text{adj}}^{\text{Me}} = \frac{k_{\text{f-ternary}}^{\text{adj-Me}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{Me}]_{\text{T}}}{k_{\text{d-ternary}}^{\text{adj-Me}} + k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}]_{\text{T}} + k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{DFB}]_{\text{T}}} \quad (35)$$

ここで、 $[\text{Cit}]_{\text{T}} \approx [\text{Cit}]_{\text{f}}$ 、 $[\text{DFB}]_{\text{T}} \approx [\text{DFB}]_{\text{f}}$ 、 $[\text{Me}]_{\text{T}} \approx [\text{Me}]_{\text{f}}$ と近似した。

以上より、Me 存在下における adjunctive 経路の速度定数 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ は、新たに次のように表すことができる。

$$k_{\text{adj}}^{\text{app}} = k_{\text{adj}}^{\text{Me}} + k_{\text{adj}}^{\text{disj}} + 18 \quad (36)$$

$k_{\text{f-FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \gg k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}]_{\text{T}}$ と同様に $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \gg k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{DFB}]_{\text{T}}$ が成り立つと仮定すると、式 35 は次のように近似できる。

$$k_{\text{adj}}^{\text{Me}} \approx \frac{k_{\text{f-ternary}}^{\text{adj-Me}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{Me}]_{\text{T}}}{k_{\text{d-ternary}}^{\text{adj-Me}} + k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}]_{\text{T}}} \quad (37)$$

式 37 において、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \gg k_{\text{d-ternary}}^{\text{adj-Me}}$ であれば、 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ は次式のように $[\text{Me}]_{\text{T}}/[\text{Cit}]_{\text{T}}$ に関して線形となる。

$$k_{\text{adj}}^{\text{app}} \approx \frac{k_{\text{f-ternary}}^{\text{adj-Me}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}}}{k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}}} \frac{[\text{Me}]_{\text{T}}}{[\text{Cit}]_{\text{T}}} + 18 \quad (38)$$

一方、 $k_{\text{f-FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}]_{\text{T}} \ll k_{\text{d-ternary}}^{\text{adj-Me}}$ であれば、 $k_{\text{adj}}^{\text{app}}$ は次式のように $[\text{Me}]_{\text{T}}$ に関して線形であると考えられる。

$$k_{\text{adj}}^{\text{app}} \approx \frac{k_{\text{f-ternary}}^{\text{adj-Me}} k_{\text{f-FeDFB}}^{\text{adj-Me}}}{k_{\text{d-ternary}}^{\text{adj-Me}}} [\text{Me}]_{\text{T}} + 18 \quad (39)$$

このような線形性について調べたところ、Ca については、 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ と $[\text{Ca}]_{\text{T}}$ の間に、Mg については、 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ と $[\text{Mg}]_{\text{T}}/[\text{Cit}]_{\text{T}}$ の間に線形性が見られた(図-8と図-9)。従って、CaとMgが存在する場合、それぞれ式39と式38が成り立っているものと予想される。このことは、adjunctive経路

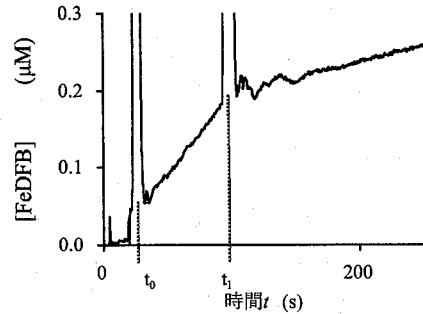


図-7 adjunctive 経路からの FeDFB 生成速度に及ぼす Ca の影響。初期の状態として $[\text{Mg}]_{\text{T}} = 50 \text{ mM}$ 、 $[\text{Fe}]_{\text{T}} = 1 \text{ μM}$ 、 $[\text{Cit}]_{\text{T}} = 1 \text{ mM}$ を含む溶液に、時間 t_0 において DFB を 1 μM となるように添加し、さらに時間 t_1 にて Ca を 10 mM となるよう添加した。 k_{overall} は式2に示されるように FeDFB 生成速度と正に対応しており、時間 t_1 において k_{overall} が低下したことが分かる。

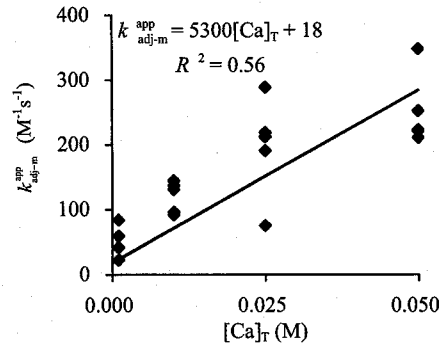


図-8 adjunctive 経路における反応速度定数 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ と $[\text{Ca}]_{\text{T}}$ の関係。 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ は $k_{\text{overall}} - k_{\text{disj-m}}^{\text{app}}$ により求めた推定値である。

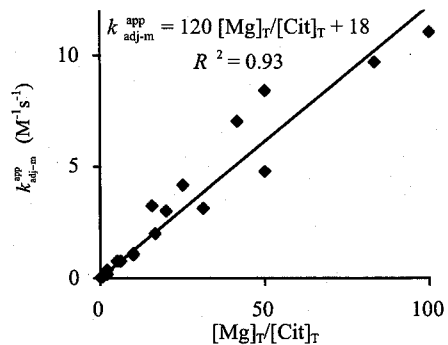


図-9 adjunctive 経路における反応速度定数 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ と $[\text{Mg}]_{\text{T}}/[\text{Cit}]_{\text{T}}$ の関係。 $k_{\text{adj-m}}^{\text{app}}$ は $k_{\text{overall}} - k_{\text{disj-m}}^{\text{app}}$ により求めた推定値である。

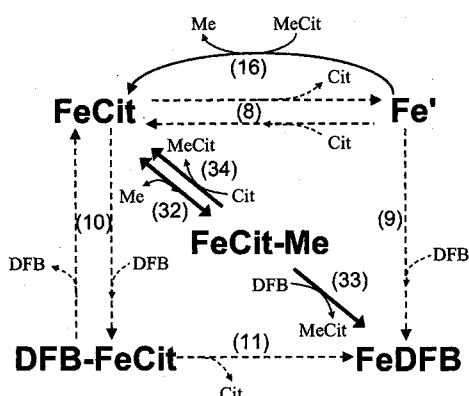


図-10 本研究にて最終的に構築したリガンド交換動力学モデル。従来の反応を破線で、本研究にて新たに加えた反応を実線(adjunctive 経路は太線, disjunctive 経路は細線)で表した。括弧付き番号は本文中の式番号に対応する。

において、Mg溶液の場合のみ、 k_{d-FeCh}^{adj} が $[Cit]_T$ に大きく影響を受けた結果と一致する(図-6)。

以上のように、adjunctive経路における反応速度定数は、MeやCit濃度により影響を受けたものの、MeがFeCitに付加して形成される3元錯体を考慮することで、動力学モデルにより説明することができた。本研究にて最終的に構築したリガンド交換動力学モデルを図-10に示した。

本研究では、モデル化合物であるクエン酸や人工的に作成した溶液を用いたことから、実際の沿岸域環境とは状況が異なると考えられる。しかし、厳密でよく定義された実験系を構築することにより、非常に複雑であるリガンド交換反応モデルの妥当性を検討することができた。既往の研究において、Cit や DFB は、それぞれ自然有機物質やシデロフォアのモデルリガンドとして認識されていることから、本研究で構築・検証されたモデルは、沿岸域でのリガンド交換動力学についての理解を深めることに貢献するポテンシャルを有していると考えられる。

4. まとめ

本研究では、二価金属イオン(Ca, Mg)が存在する条件下で、有機鉄錯体(FeCit)と競合リガンド(DFB)のリガンド交換動力学を調べた。はじめに、Cit が二価金属イオンと錯形成する影響を考慮した動力学モデル(図-3)を構築した。Ca 存在下において、disjunctive 経路によるリガンド交換反応は、このモデルによりよく説明することができた。動力学モデルから、disjunctive 経路では Ca や Mg

が Cit と錯体を形成し、FeCit の形成速度を減少させるため、FeCit と DFB のリガンド交換反応を促進させることが示された。adjunctive 経路では、反応速度が Cit や二価金属の濃度により影響を受けることが明らかとなった。そこで、二価金属が FeCit に付加して形成される 3 元錯体を動力学モデルに新たに考慮することで、adjunctive 経路におけるリガンド交換反応を説明することができた。これらの過程を経て、最終的に図-10 により表現される動力学モデルが構築された。

謝 辞：本研究は日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究A(16254001)および特別研究員奨励費(04725)によって行われたことを報告する。

付録

付録1.式12の算出

式8, 9の Fe' について、定常状態近似より、

$$\frac{d[Fe']}{dt} = k_{d-FeCh}^{disj} [FeCit] - k_{f-FeCh}^{disj} [Fe'] [Cit] - k_{f-FeDFB}^{disj} [Fe'] [DFB] = 0$$

$$[Fe'] = \frac{k_{d-FeCh}^{disj} [FeCit]}{k_{f-FeCh}^{disj} [Cit] + k_{f-FeDFB}^{disj} [DFB]}$$

式9よりFeDFB生成速度は次式で表される。

$$\begin{aligned} \frac{d[FeDFB]}{dt} &= k_{f-FeDFB}^{disj} [Fe'] [DFB] \\ &= \frac{k_{d-FeCh}^{disj} k_{f-FeDFB}^{disj}}{k_{f-FeCh}^{disj} [Cit] + k_{f-FeDFB}^{disj} [DFB]} [FeCit] [DFB] \end{aligned}$$

これと式2との比較より、 k_{disj} は式12で表される。

付録2.式13の算出

式10, 11のDFB-FeCitについて、定常状態近似より、

$$\begin{aligned} \frac{d[DFB-FeCit]}{dt} &= k_{f-ternary}^{adj} [FeCit] [DFB] - k_{d-ternary}^{adj} [DFB-FeCit] = 0 \\ [DFB-FeCit] &= \frac{k_{f-ternary}^{adj} [FeCit] [DFB]}{k_{d-ternary}^{adj} + k_{f-FeDFB}^{adj}} \end{aligned}$$

式11よりFeDFB生成速度は次式で表される。

$$\begin{aligned} \frac{d[FeDFB]}{dt} &= k_{f-FeDFB}^{adj} [DFB-FeCit] \\ &= \frac{k_{f-ternary}^{adj} k_{f-FeDFB}^{adj}}{k_{d-ternary}^{adj} + k_{f-FeDFB}^{adj}} [FeCit] [DFB] \end{aligned}$$

これと式2との比較より、 k_{adj} は式13により表される。

付録3.式22の算出

式8, 9及び式16逆反応の Fe' について、定常状態近似

より,

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{Fe}']}{dt} &= k_{d-\text{FeCit}}^{\text{disj}} [\text{FeCit}] - k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Fe}'] [\text{Cit}] \\ &\quad - k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{Fe}'] [\text{DFB}'] - k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj-Me}} [\text{Fe}'] [\text{MeCit}] \\ &= k_{d-\text{FeCit}}^{\text{disj}} [\text{FeCit}] - k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}'] [\text{Fe}'] \\ &\quad - (k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj}} [\text{Cit}] + k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj-Me}} [\text{MeCit}]) [\text{Fe}'] \\ &= k_{d-\text{FeCit}}^{\text{disj}} [\text{FeCit}] - k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}'] [\text{Fe}'] \\ &\quad - k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj-app}} [\text{Cit}'] [\text{Fe}'] \\ &= 0\end{aligned}$$

$$[\text{Fe}'] = \frac{k_{d-\text{FeCit}}^{\text{disj}} [\text{FeCit}]}{k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj-app}} [\text{Cit}'] + k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}']}$$

式8よりFeDFB生成速度は次式で表される.

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{FeDFB}]}{dt} &= k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{Fe}'] [\text{DFB}'] \\ &= \frac{k_{d-\text{FeCit}}^{\text{disj}} k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}}}{k_{f-\text{FeCit}}^{\text{disj-app}} [\text{Cit}'] + k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}} [\text{DFB}']} [\text{FeCit}] [\text{DFB}']\end{aligned}$$

これと式2との比較より, $k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{disj}}$ は式22で表される.

付録4.式35の算出

式32, 33, 34のFeCit-Meについて, 定常状態近似より,

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{FeCit-Me}]}{dt} &= k_{f-\text{ternary}}^{\text{adj-Me}} [\text{FeCit}] [\text{Me}] - k_{d-\text{ternary}}^{\text{adj-Me}} [\text{FeCit-Me}] \\ &\quad - k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{FeCit-Me}] [\text{DFB}'] \\ &\quad - k_{f-\text{FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{FeCit-Me}] [\text{Cit}'] \\ &= 0\end{aligned}$$

$$[\text{FeCit-Me}] = \frac{k_{f-\text{ternary}}^{\text{adj-Me}} [\text{FeCit}] [\text{Me}]}{k_{d-\text{ternary}}^{\text{adj-Me}} + k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{DFB}'] + k_{f-\text{FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}']}$$

式34よりFeDFB生成速度は次式で表される.

$$\begin{aligned}\frac{d[\text{FeDFB}]}{dt} &= k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{FeCit-Me}] [\text{DFB}'] \\ &= \frac{k_{f-\text{ternary}}^{\text{adj-Me}} k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{adj-Me}}}{k_{d-\text{ternary}}^{\text{adj-Me}} + k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{adj-Me}} [\text{DFB}'] + k_{f-\text{FeCit}}^{\text{adj-Me}} [\text{Cit}']} [\text{Me}] [\text{FeCit}] [\text{DFB}']\end{aligned}$$

これと式2との比較より, この経路におけるFeDFB生成速度定数 $k_{f-\text{FeDFB}}^{\text{adj-Me}}$ は式35のように表される.

参考文献

- 1) Sunda, W. G., Huntsman, S. A. (1995) Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton, *Marine Chemistry* **50**, 189-206.
- 2) Crichton, R. (2001) Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences, 2nd ed.; John Wiley and Sons: Chichester, England.
- 3) Bruland, K. W., Rue, E. L. (2002) In the Biogeochemistry of Iron in Seawater, Turner, D. R., Hunter, K. A., Eds.; Wiley: New York, Ch. 6, pp 255-289.
- 4) Rose, A. L., Waite, T. D. (2002) Kinetic model for Fe(II) oxidation in seawater in the absence and presence of natural organic matter. *Environmental Science and Technology* **36**, 433-444.

- 5) Liu, X., Millero, F. J. (2002) The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry* **153**, 255-262.
- 6) Kuma, K., Tanaka, J., Matsunaga, K., (1999) Effect of natural and synthetic organic-Fe(III) complexes in an estuarine mixing model on iron uptake and growth of a coastal marine diatom, *Chaetoceros sociale*. *Marine Biology* **134**, 761-769.
- 7) Tipping, E. (2002) Cation Binding by Humic Substances, Cambridge University Press, UK.
- 8) Shaked, Y., Kustka, A. B., Morel, F. M. M., (2005) A general kinetic model for iron acquisition by eukaryotic phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **50**, 872-882.
- 9) Sunda, W. G. (2002) In the Biogeochemistry of Iron in Seawater, Turner, D. R., Hunter, K. A., Eds.; Wiley: New York, Ch. 3, pp 41-84.
- 10) Hutchins, D. A., Witter, A. E., Butler, A., Luther, G. W., (1999) Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature* **400**, 858-861.
- 11) Witter, A. E., Hutchins, D. A., Butler, A., Luther, G. W. III, (2000) Determination of conditional stability constants and kinetic constants for strong model Fe-binding ligands in seawater. *Marine Chemistry* **69**, 1-17.
- 12) Rose, A. L., Salmon, T. P., Lukondh, T., Neilan, B. A., Waite, T. D. (2005) Use of superoxide as an electron shuttle for iron acquisition by the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, *Environmental Science and Technology* **39**, 3708-3715.
- 13) Hernandez, M. E., Newman, D. K. (2001) Extracellular electron transfer, *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 1562-1571.
- 14) Kustka, A. B., Shaked, Y., Milligan, A. J., King, D. W., Morel, F. M. M., (2005) Extracellular production of superoxide by marine diatoms: Contrasting effects on iron redox chemistry and bioavailability. *Limnology and Oceanography* **50**, 1172-1180.
- 15) Rose, A. L., Waite, T. D. (2003) Kinetics of Iron complexation by dissolved natural organic matter in coastal waters, *Marine Chemistry* **84**, 85-103.
- 16) Wu, J., Luther, G. W. III, (1995) Complexation of Fe(III) by natural organic ligands in the Northwestern Atlantic Ocean by a competitive ligand equilibration method and a kinetic approach. *Marine Chemistry* **50**, 159-167.
- 17) Rue, E. L., Bruland, K. W., (1995) Complexation of iron(III) by natural organic ligands in the Central North Pacific as determined by a new competitive ligand equilibration/adsorptive cathodic stripping voltammetric method. *Marine chemistry* **50**, 117-138.
- 18) Fallor, B., Nick, H., (1994) Kinetics and mechanism of iron(III) removal from citrate by desferrioxamine B and 3-hydroxy-1,2-dimethyl-4-pyridone. *Journal of the American Chemical Society* **116**, 3860-3865.
- 19) Bates, G. W., Billups, C., Saltman, P., (1967) The kinetics and mechanism of iron(III) exchange between chelates and transferring. I. The complexes of citrate and nitrilotriacetic acid. *Journal of Biological Chemistry* **242**, 2810-2815.
- 20) Celis, V., Murimbah, J., Salam, M. S. A., Chakrabarti, C. L. (2001) A

- Kinetic Study of Nickel Complexation in Model Systems by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry. *Environmental Science and Technology* **35**, 1084-1089.
- 21) Hering, J. G., Morel, F. M. M. (1990) Kinetics of Trace Metal Complexation: Ligand-Exchange Reactions, *Environmental Science and Technology* **24**, 242-252.
- 22) Hering, J. G., Morel, F. M. M. (1988) Kinetics of Trace Metal Complexation: Role of Alkaline-Earth Metals, *Environmental Science and Technology* **22**, 1469-1478.
- 23) Mandal, R., Salam, M. S. A., Murimboh, J., Hassan, N. M., Chakrabarti, C. L., Back, M. H., Gregoire, D. C., (2000) Competition of Ca(II) and Mg(II) with Ni(II) for binding by a well-characterized fulvic acid in model solutions. *Environmental Science and Technology* **34**, 2201-2208.
- 24) Hudson, R. J. M., Covault, D. T., Morel, F. M. M., (1992) Investigations of iron coordination and redox reactions in seawater using ^{59}Fe radiometry and ion-pair solvent extraction of amphiphilic iron complexes. *Marine Chemistry* **38**, 209-235.
- 25) Rose, A. L., Waite, T. D. (2003) Kinetics of Hydrolysis and Precipitation of Ferric Iron in Seawater, *Environmental Science and Technology* **37**, 3897-3903.
- 26) Macrellis, H. M., Trick, C. G., Rue, E. L., Smith, G., Bruland, K. W., (2001) Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater. *Marine Chemistry* **76**, 175-187.
- 27) Rose, A. L., Waite, T. D. (2003) Effect of Dissolved Natural Organic Matter on the Kinetics of Ferrous Iron Oxygenation in Seawater, *Environmental Science and Technology* **37**, 4877-4886
- 28) Pierwola, A., Krupinski, T., Zalupski, P., Chiarelli, M., Castignetti, D. (2004) Degradation Pathway and Generation of Monohydroxamic Acids from the Trihydroxamate Siderophore Deferrioxamine B, *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 831-836
- 29) Fujii, M., Rose, A. L., Waite, T. D., Omura, T. (2007) Kinetics of Fe(III)-Organic Ligand Complex in Natural Waters in the Absence and Presence of Divalent Cation, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, (Submitted)
- 30) Pham, A. N., Rose, A. L., Feitz, A. J., Waite, T. D. (2006) Kinetics of Fe(III) precipitation in aqueous solutions at pH 6.0-9.5 and 25°C, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**, 640-650.
- 31) Birus, M., Krznaric-Vohalski, G., Kujundzic, N., Nigovic, B., Pribanic, M., (1998) Kinetics and mechanism of iron exchange in hydroxamate siderophores: Catalysis of the iron(III) transfer from ferrioxamine B to ethylenediaminetetraacetic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry* **70**, 253-263.

(2007. 5. 25 受付)

Ligand-Exchange Kinetics of Fe(III)-Citrate Complex with Desferrioxamine B in the Presence of Divalent Metals

Hiroaki ITO¹, Manabu FUJII¹, Shiori SASAKI¹,
T. David WAITE² and Tatsuo OMURA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

²Dept. of Civil and Environmental Engineering, The University of New South Wales

We have developed a kinetic model for ligand-exchange reaction of ferric iron-citrate complex (FeCit) with desferrioxamine B (DFB) in the presence of divalent metals (Ca and Mg). The kinetic model considers (1) a disjunctive pathway where DFB binds to Fe following the dissociation of FeCit and (2) an adjunctive pathway where FeDFB is formed via the direct association of DFB to FeCit. The rate constants for the complex reaction in the disjunctive pathway estimated from the model well described the experimentally determined rate constants. In the adjunctive pathway, the reaction rate was found to be affected by the concentrations of divalent cations and citrate. The kinetic data in the adjunctive pathway was well explained by involving the effect of direct association of divalent cation to the precursor complex. The results indicated the significant effect of divalent cations on the kinetics for the ligand-exchange of iron-citrate complex with DFB.