報 文

フミン物質とリポソームとの相互作用

吉田章一郎・篠塚 則子・渡辺 正・早野 茂夫*

東京大学生産技術研究所 (〒106 東京都港区六本木 7-22-1)

* 大妻女子大学 (〒102 東京都千代田区三番町 12 番地)

Interaction of Humic Substances with Liposomes

Shoichiro YOSHIDA, Noriko SHINOZUKA, Tadashi WATANABE,
and Shigeo HAYANOInstitute of Industrial Science, University of Tokyo
(Roppongi, Minato-ku, Tokyo, 〒106)* Otsuma Women's University
(Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo, 〒102)

The effects of marine and terrestrial humic substances on the K^+ -permeability of lipid bilayer of dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) liposomes were investigated for their physiological activity on biological membranes. Commercial humic acid and humic and fulvic acids extracted from soil and marine sediment were used for the experiment.

Potassium ions inside liposomes were released through the DMPC bilayer following the addition of humic acid. The effect of humic acid was conspicuous above the phase transition temperature of DMPC. Humic acids containing many carboxyl groups but few phenolic and alcoholic hydroxyl groups had little effect on the K^+ -permeability of the bilayer. From the relation between the K^+ -permeability and the degree of humification determined by optical spectroscopy, humic acids humified to a lesser extent were found to interact strongly with liposomes. The K^+ -permeability enhancing effect was stronger in the case of highly aliphatic marine humic acids than highly aromatic terrestrial acids. Hydrophilic fulvic acid exerted virtually no effect on K^+ -permeability. The hydrophobic chain of the acid would thus appear to be incorporated into the hydrophobic core of lipid bilayer, enhancing the fluidity of the lipid.

The lower molecular weight fractions of marine humic acids promoted K^+ -release more than the original humic acids. The commercial humic acids with smaller molecular size affected strongly K^+ -permeability compared to marine humic acids having essentially the same humification and functional group content. This molecular size effect indicates the rates of adsorption of humic acid molecules onto and their incorporation into the lipid bilayer to possibly contribute to interactions with liposomes.

1 緒 言

主として植物の腐食物と言われるフミン物質は、土壌、堆積物、自然水中の有機物質の主要な部分を占め、地球上に広く分布している¹⁾。土壌圏、水圏において様々な役割を演じていると考えられ、その一つとして高等植物や植物プランクトンの生長促進作用が注目されている^{2), 3)}。高等植物に関しては、土壌、砂、培養液中に低濃度のフミン物質を添加することにより生育が促進され

たり、栄養源の吸収が促進される例が多数報告されている²⁾。藻類の生長や代謝に与える効果についても種々検討されている。初期の研究において、土壌、泥炭、河川水などから抽出した腐食質の添加によって藻類の生長が促進される事実が観測されていたが、フミン物質の関与については間接的な推定にすぎなかった³⁾。Prakash と Rashid は海底堆積物から抽出・精製したフミン酸とフルボ酸を海産性植物プランクトン (dinoflagellates と diatom) に作用させて生長促進効果を見だし、フ

ミン物質の直接的関与を明らかにした⁴⁾。その後多数の研究者により植物プランクトンに対する同様の作用が報告され、栄養源(窒素、リン、鉄イオンなど)吸収との相関^{5), 6)}、低分子量フミン酸共存による効果の増大⁷⁾、重金属取り込みの抑制⁸⁾、精製フミン酸による細胞分裂促進⁹⁾などが明らかにされている。これらの生長促進作用に関し、栄養源との相互作用、金属との錯形成、キレート効果による毒性物質や重金属の除去、細胞増殖にかかわる生理作用などにフミン物質がかかわるものと推定されているが³⁾、その作用機構は明らかでない。しかし少なくともその一端はフミン物質と生体膜との相互作用であると考えられる。

著者らはこのようなフミン物質の生理活性に着目し、生体膜の基本骨格である脂質二分子膜リポソームとの相互作用を調べ、イオンの膜透過促進、リポソーム凝集の誘発、リン脂質の流動性向上作用を確認した¹⁰⁾。本研究では、リポソームへの作用がフミン物質の特性とどのように関係するかを解明することを目的に、一連の海洋及び陸成フミン物質が脂質二分子膜のイオン透過性に与える効果を検討した。

2 実 験

2.1 試料の調製

海洋フミン物質は、駿河湾(Suruga-1: 北緯 34°15'00", 東経 138°30'24", 水深 560 m)、相模湾(Sagami-2: 北緯 34°57'12", 東経 139°15'36", 水深 1333 m; Sagami-3: 北緯 34°59'54", 東経 139°20'48", 水深 1488 m)、Flores 海(FS-E: 南緯 7°22'07", 東経 119°36'02", 水深 3875 m)、日本海(SJ-1: 北緯 38°17'12", 東経 135°29'30", 水深 2980 m)で採取した海底堆積物コアサンプルから抽出した。海洋フミン酸の抽出と精製及び市販フミン酸(Aldrich 社, Fluka 社)の精製は前報¹⁰⁾と同様に行った。海洋フルボ酸の精製法は以下の通りである。フミン酸回収後の酸性抽出液(pH 1)をミリポアフィルター(孔径 0.45 μm 及び 0.22 μm)で汙過し、汙液にフッ化水素酸(0.3 M)を添加してAmberlite XAD-8 樹脂カラムに通したのち、吸着フルボ酸を 0.1 M NaOH で溶離させた。この溶離液をイオン交換樹脂カラム(Amberlite IT-120 と IRA-400)に通して脱塩し、ロータリーエバポレーターによる水の除去、凍結乾燥を行って酸形フルボ酸を得た。

土壌から抽出した陸成フミン物質, Anjo Black, Kisokoma-F, Nagara-P, Inogashira は名古屋大学より提供されたものをそのまま使用した。また Sagami-2 フミン酸を限外汙過により 4 成分に分画した。限外汙過器はバイオエンジニアリング社製 MC 2 型、膜は Amicon 社 XM-300 (分画分子量: 300,000), XM-100 A (100,000), PM-10 (10,000) を使用した。

精製した酸形フミン酸とフルボ酸を 0.1 M NaOH に溶解し、塩酸で pH 8 に調整した 1 g/L 溶液を透過実験に使用した。

2.2 リポソームの調製とカリウムイオンの膜透過実験

リン脂質としてジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC, Sigma 社)を用い、Johnson と Bangham¹¹⁾の超音波処理法に従ってリポソームを調製した。DMPC のクロロホルム溶液から形成させた乾燥薄膜に 0.1 M KCl/50 mM トリス緩衝液(pH 7.8)を加え試験管ミキサー(ヤマト科学製 YM 121)でかくはんした後、水浴型ソニケーター(Branson B-32, 45 kHz)を用い窒素雰囲気下 30°C で 30 min 超音波処理した。この分散液を 0.1 M NaCl/50 mM トリス緩衝液(pH 7.8)に対し 4°C で透析を行い、リポソーム外液の K^+ を Na^+ に置換した。 K^+ の膜透過測定は、カリウムイオン選択性電極(バリノマイシンを含む PCV 膜電極)を用いて次のように行った。8 mL の 0.1 M NaCl/50 mM トリス緩衝液(pH 7.8)にリポソーム分散液(DMPC 濃度: 100 mM)を 200 μL 添加し、ただちにフミン物質のナトリウム塩水溶液(1 g/L)を 200 μL 添加した。電極電位が平衡に達したところで、Triton X-100 水溶液(1%)を応答電位が一定になるまで 50 μL ずつ添加し、応答電位から外液の K^+ 濃度を求めた。膜透過測定をおのおののフミン物質について 2 回行った結果、各時刻の K^+ 濃度は $\pm 2\%$ 以内で一致した。

2.3 フミン物質の紫外・可視吸収スペクトル

フミン物質の 0.01% 溶液(溶媒は 0.1% NaOH)の吸収スペクトルを溶液調製後 2 h 以内に 200~900 nm で測定した。

2.4 フミン物質の KMnO_4 消費量の測定

2.3 と同じ溶液 30 mL を 100 mL 三角フラスコに採り、0.1 N KMnO_4 12 mL と 2 N H_2SO_4 10 mL を加え、沸騰水中に 15 min 浸漬した後ただちに 0.1 N シュウ酸 15 mL を添加した。この溶液中の過剰のシュウ酸を 0.1 N KMnO_4 で滴定し、最初にフミン物質により消費された KMnO_4 の量(mL)を求めた。

3 結 果

3.1 フミン物質の元素組成

本実験で使用したフミン物質の元素組成及び灰分量を Table-1 に示す。土壌フミン物質の値は文献値¹²⁾を採用した。海洋フミン酸の炭素含量は土壌フミン酸より低く、原子数の比(H/C)は土壌フミン酸より海洋フミン酸の方が高い。これらの結果は、海洋フミン物質が陸起源フミン物質と比べて脂肪族的性質が強いことを示唆しており、¹³C-NMR¹³⁾及び¹³C-固体 NMR¹⁴⁾スペクトルの結果からも示唆される。陸起源の市販フミン

Table-1 Elemental composition of humic substances.

Humic substance ^{a)}	C (%)	H (%)	N (%)	Ash (%)	H/C
Aldrich HA	53.9	3.9	0.75	0.7	0.87
Fluka HA	46.9	5.6	1.4	tr.	1.43
Sagami-2 HA	52.0	6.1	5.5	tr.	1.41
Sagami-2 FA	45.3	4.8	3.8	tr.	1.27
Sagami-3 HA	48.0	5.2	4.6	8.1	1.30
Suruga-1 HA	50.7	5.7	3.9	9.8	1.35
SJ-1 HA	51.7	4.77	4.04	6.5	1.11
FA-E HA	47.9	5.8	5.1	7.1	1.45
Anjo Black HA	56.4	4.9	4.2	6.8	1.03
Nagara-P HA	56.1	2.5	2.3	4.6	0.53
Kisokoma-F HA	59.0	6.0	6.0	tr.	1.20
Inogashira HA	54.77	4.26	4.01	0.37	0.93
Inogashira FA	43.27	3.47	1.72	5.99	0.96

a) HA : Humic acid ; FA : Fulvic acid.

酸(Aldrich HA)及び海洋フミン酸(Sagami-3 HA)の¹³C-固体NMRスペクトルから求めたカルボキシル基を除く全炭素に対する芳香族性炭素の割合はそれぞれ23%と19%であり¹⁴⁾, 海洋フミン酸の方が脂肪族の性質が強いことを裏付けている。

一方フルボ酸の炭素含量は海洋, 陸成ともにフミン酸より低く, 全酸度¹⁵⁾もフミン酸に比べて高いことから,

HA : Sagami-2 humic acid, FA : Sagami-2 fulvic acid.

Fig.-1 Response of the K^+ -selective electrode to the addition of humic substances to DMPC liposomes.

フルボ酸はかなり親水性であることが示唆される。

3.2 K^+ の膜透過に及ぼすフミン物質の影響

内液に K^+ を含みリポソームにフミン物質を添加した際の K^+ 電極の応答をFig.-1に示す。電位の上昇は外液の K^+ 濃度の増大に対応する。点線はフミン物質及びTriton X-100を添加しない場合の K^+ 濃度の変化であり, 脂質二分子膜自身の透過性を示している。30°Cではフミン酸の添加と同時に内液の K^+ の急激な放出が観測された。Triton X-100添加後はリポソームの崩壊により一定電位まで上昇し, 系中の K^+ 全濃度に相当する電位を示した。一方, DMPCの相転移温度(23°C)以下ではフミン酸の影響はなく, Tritonの作用によって初めて K^+ の放出が見られた。温度の影響は他のフミン酸でも同様であり, 液晶状態の膜に対してフミン酸の作用が顕著に現れた。フルボ酸については海洋, 陸成ともに30°Cの液晶状態の膜でも放出促進作用は観測されなかった。

3.3 K^+ の膜透過性とフミン物質の官能基含量との関係

K^+ の膜透過性とフミン物質の官能基(カルボキシル基, フェノール性ヒドロキシル基, アルコール性ヒドロキシル基)含量との関係をFig.-2に示す。 K^+ 透過性はFlukaフミン酸を作用させたときの透過率(P_F)に対するおのこの透過率(P)の比によって評価した。ここで $P=C/C_T$ であり, C はフミン物質添加5 min後の外液の K^+ 濃度, C_T はTriton添加後の K^+ 全濃度である。点線はリポソーム自身の透過性を表す。おのこのフミン物質の官能基含量は文献値^{12), 16)}を採用した。土壌から抽出した陸成フミン酸の場合, カルボキシル基が少なくフェノール性及びアルコール性ヒドロキシル基

○ : terrestrial humic substance, ● : marine humic substance, FA : fulvic acid, F : Fluka humic acid, A : Aldrich humic acid. P and P_F denote the K^+ permeation coefficient on addition of the humic substance and Fluka humic acid, respectively; $P = C/C_T$, C : K^+ concentration outside the liposomes after 5 min, C_T : total concentration of K^+ .

Fig.-2 Relationship between the K^+ permeability of DMPC bilayer at 30°C and the content of functional groups in humic substances.

が多いほどイオン透過促進効果が大きかった。同じ陸成フミン酸でも市販品 (Aldrich, Fluka) は、カルボキシル基が比較的多くアルコール性ヒドロキシル基が少ないがその効果はかなり大きい。一方、海洋フミン酸は同程度の官能基を含む土壌フミン酸より促進効果が大きかった。フェノール性ヒドロキシル基との関係について見ると、いずれのフミン物質でもその含量の増加とともに促進効果が上昇する傾向がある。

3.4 K^+ の膜透過性とフミン物質のフミン化度との関係

Fig.-3 にはフミン物質のフミン化度とイオン透過性との関係を示す。フミン化度の指標として熊田¹⁷⁾やSimonら¹⁸⁾が定義した以下の3つのパラメーター (色調係数) を用いた。

① E_4/E_6 ; E_4 と E_6 はそれぞれ 465 nm と 665 nm における吸光度。

② $\Delta \log K = \log K_{400} - \log K_{600}$; K_{400} と K_{600} はそ

○ : terrestrial humic acid, ● : marine humic acid, △ : terrestrial fulvic acid, ▲ : marine fulvic acid, □ : commercial humic acid. P/P_F is the same as in Fig.-2.

Fig.-3 Relationship between the K^+ permeability of DMPC bilayer at 30°C and the degrees of humification (RF , $\Delta \log K$, E_4/E_6).

れぞれ 400 nm と 600 nm における吸光係数。

③ $RF = (K_{600} \times 1000) / KMnO_4$ 消費量 (mL)。

すなわち、 RF 値が大きいくほど、 E_4/E_6 及び $\Delta \log K$ が小さいほどフミン化度が高い。Fig.-3 からわかるように、フミン酸についてはフミン化度が低いほど K^+ の膜透過を促進させる傾向がある。

3.5 K^+ の膜透過性に与えるフミン酸分子量の効果

K^+ の膜透過性に対する海洋フミン酸 (Sagami-2) の分子量の影響を、海洋フルボ酸 (Sagami-2-FA) と Fluka フミン酸の値と併せて Table-2 に示す。分画成分の分子量は、用いた限外ろ過膜の分画分子量に基づくものでフミン酸自身の正確な分子量を示すものではないが、その序列は変わらないと考えられる¹⁹⁾。ただし F4 については試料量が少なく、添加した溶液が低濃度 (他の試料の 1/3) であるため F3 より作用が小さい。しかし 5 min 後の透過率は F2 より若干高くなっているで、同濃度で作用させれば最も効果が大きくなると推定される。フルボ酸は全く影響を与えなかったのもその値はリポソーム膜自身の透過率を示しており、いずれのフ

Table-2 Effect of molecular size of humic acid (HA) on K^+ -release from liposomes at 30°C.

Time (min)	Permeability (%) ^a						
	Sagami-2 HA					Sagami-2 FA	Fluka HA
	F 0	F 1	F 2	F 3	F 4		
3	59	56	67	74	63	25	66
5	65		74	81	76	28	71

a $(C/C_T) \times 100$, C : concentration of K^+ , C_T : total concentration of K^+ , Molecular size sequence: $F 1 > 300,000 > F 2 > 100,000 > F 3 > 10,000 > F 4$. F 0: original sample of Sagami-2 HA. [DMPC]: 2.4 mM; [HA] or [FA]: 24 mg/L.

ミン酸もその値をはるかに超えている。また低分子量成分は Fluka フミン酸をしのぐ作用を示している。従って、フミン酸の化学的性質とともに分子のサイズも膜透過に寄与していることが示唆される。

4 考 察

フミン酸は親水基を持つ高分子電解質であるとともに水の表面張力を低下させ、界面活性を示すことが知られる。表面張力とフミン酸濃度との相関から、通常の界面活性剤と同様の会合体形成が示唆されている¹⁹⁾。会合体形成濃度はフミン酸溶液中の塩濃度の上昇により低濃度側にシフトする。たとえば Sagami-2 フミン酸の場合、会合体形成濃度は 0.1% NaCl 中で 0.06%, 1% NaCl 中で 0.025% ある¹⁹⁾。イオン透過実験の溶液系では NaCl が 0.6% (0.1 M), フミン酸濃度が 0.0024% であるので、フミン酸は単分子分散していると推定される。

このようにフミン酸が界面活性を示すことから、かなり強い疎水基の存在が示唆されている^{19), 20)}。土壌から抽出したフミン酸の場合、①カルボキシル基が多く酸度が高いほど K^+ 透過性に及ぼす影響が小さいこと、②フミン酸より炭素量が少なくカルボキシル基がかなり多いフルボ酸が全く作用しなかったことを併せて考えると、 K^+ 透過性の結果は、フミン酸の疎水基とリン脂質二分子膜の疎水部との相互作用を示唆する。すなわち、脂質二分子膜に対するタンパク質の作用に関して指摘されているように²¹⁾、膜に吸着したフミン酸の疎水基が脂質膜の疎水部に潜り込んで脂質分子の配向を乱すことによりイオン透過のバリアー能が低下したと考えられる。海洋フミン酸は陸成フミン酸より脂肪族性の性質が強いので、この脂肪族炭化水素鎖の作用が強く働いて膜透過性を高めたと推定される。なおリポソームのゲルクロマトグラムはフミン酸共存下でも変化しないことから、フミン酸による膜の崩壊はないものと考えられる¹⁰⁾。

フミン物質の形成とそのフミン化は土壌圏における有機物質の安定化の一つの方向であり、有機物から各種の炭化水素、水、酸素などが脱離して次第に炭素に富む物

質に移行する過程である²²⁾。この過程は色調変化を伴い、とくに土壌のフミン物質については色調係数によるキャラクタリゼーションが行われている²²⁾。本研究で用いたフミン物質に関しても色調係数を測定しリポソームに対するイオン透過促進作用との相関を検討した結果、フミン化度が低いほどリポソームに対する作用が強い傾向が見いだされた。海洋フミン酸に対しこのような色調係数評価が試みられた例はないが、フミン化度に関して同様の傾向が認められる。一般にフミン化の進行とともにカルボキシル基とカルボニル基が増加し、アルコール性及びフェノール性ヒドロキシル基が減少する。したがって、Fig.-2 に示す官能基との関係と Fig.-3 に示すフミン化度との関係とは一致しており、フミン酸の疎水基の作用を示唆する。

しかし、カルボキシル基が比較的多い市販のフミン酸がかなり強い作用を示すので、本実験の結果を単に疎水性のみで説明することはできない。Table-2 に示すように、低分子量のフミン酸ほど膜に対する作用が大きいくことを考えると、短時間の作用においては膜への配向の速さも寄与していることが示唆される。したがって、分子量の小さい²³⁾市販のフミン酸では、疎水部間の相互作用はあるにしても、膜表面への吸着と膜内への侵入が速いために効果が顕著に現れたものと考えられる。

以上のように、フミン物質の特性と脂質二分子膜のイオン透過性との間にいくつかの相関が明らかとなり、これらは脂質二分子膜に対するフミン物質の作用機構の一端を反映するものと考えられる。

貴重なフミン物質を提供して戴いた鋤塚昭三教授（名古屋大学）に感謝致します。

〔平成 2 年 (1990 年) 11 月 2 日受理〕

文 献

- 1) M. Schnitzer, S.U. Khan, "Humic Substances in the Environment", Marcel Dekker (1972), p. 1
- 2) M.M. Kononova, "Soil Organic Matter", Oxford Pergamon Press (1966), p. 544; D. Vaughan,

- R.E. Malcolm, "Soil Organic Matter and Biological Activity", Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers (1985)
- 3) M.A. Rashid, "Geochemistry of Marine Humic Compound", Springer-Verlag (1985), p. 248
 - 4) A. Prakash, M.A. Rashid, "Proc. Int. Mtg. Humic Substances Nienwersluis", Wageningen (1972)
 - 5) A. Prakash, M.A. Rashid, *Limnol. and Oceanogr.*, **13**, 598 (1968)
 - 6) A.M. Devol *et al.*, *Hydrobiologia*, **109**, 97 (1984); D. Gedziorowska *et al.*, *Limnologica*, **15**, 319 (1984)
 - 7) A. Prakash, M.A. Rashid, *Limnol. and Oceanogr.*, **18**, 516 (1973); A.J. Stewart, R.G. Wetzel, *Freshwater Biology*, **12**, 369 (1982)
 - 8) J. Vymazal, *Hydrobiologia*, **119**, 171 (1984)
 - 9) 徳田 広, 日本水産学会春季大会(1972.4)
 - 10) 早野茂夫, 篠塚則子, 池ノ上芳章, 油化学, **31**, 527 (1982)
 - 11) S.M. Johnson, A.D. Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 82 (1969)
 - 12) Kisokoma-F HA, Nagara-P HA, Anjo Black HA : S. Kuwatsuka K. Tsutsuki, K. Kumada, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **24**, 337 (1978); Inogashira HA, Inogashira FA : 篠塚昭三, 第2回腐植物質研究会, (1985. 8)
 - 13) Y. Saito, S. Hayano, *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **36**, 286 (1981)
 - 14) 芳香族性炭素の割合 = $\{ \text{ピーク面積}_{108-165 \text{ ppm}} / (\text{ピーク面積}_{0-230 \text{ ppm}} - \text{ピーク面積}_{160-230 \text{ ppm}}) \} \times 100$; 標準物質 : TMS; 篠塚, 李, 川崎, 日本化学会第58春季年会予稿集 I, p. 901 (1989. 4)
 - 15) Inogashira HA : 6.31 meq/g; Inogashira FA : 10.73 meq/g; 篠塚, 第2回腐植物質研究会(1985. 8)
 - 16) Aldrich HA, Sagami-2 HA, Suruga-1 HA : Y. Saito, S. Hayano, *J. Oceanogr. Soc. Jpn.*, **36**, 59 (1980); Fluka HA : J. H. Weber, S. A. Wilson, *Water Res.*, **9**, 1079 (1975)
 - 17) K. Kumada, *Soil Sci. Plant Nutr.*, **11**, 11 (1965)
 - 18) K. Simon, H. Speichermann, *Bodenk. Planzenernahr.*, **8**, 129 (1938)
 - 19) S. Hayano, N. Shinozuka, M. Hyakutake, *Yukagaku*, **31**, 357 (1982)
 - 20) K. Hayase, H. Tsubota, *J. Colloid Interface Sci.*, **114**, 220 (1986)
 - 21) R.L. Juliano, H.K. Kimelberg, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 894 (1971); H. K. Kimberg, D. Papahadjopoulos, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1142 (1971); *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 805 (1971); J. H. Kaplan, *ibid.*, **290**, 339 (1972); R. M. Gould, Y. London, *ibid.*, **290**, 200 (1972); P. Calissano, A. D. Bangham, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 504 (1971)
 - 22) 熊田恭一, "土壤有機物の化学", 東京大学出版会(1977), p. 20
 - 23) R.L. Malcolm, P. MacCarthy, *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 904 (1986); P. F. Landrum *et al.*, *ibid.*, **18**, 187 (1984)