フルボ酸第二鉄錯体とシデロフォア Desferrioxamine B の リガンド交換速度論モデルの構築

伊藤 紘 晃* 藤井 学*
真 砂 佳 史* 大 村 達 夫*

Kinetic Model of Ligand Exchange between Fe(III)-Fulvic Acid Complex and Siderophore Desferrioxamine B

Hiroaki ITO*, Manabu FUJII*,
Yoshifumi MASAGO* and Tatsuo OMURA*

* Department of Civil and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aoba 6-6-06, Aoba-ku, Sendai 980-8579, Japan

Abstract

As a ligand exchange kinetic model of an Fe(III)-fulvic acid complex and a siderophore, desferrioxamine B (DFOB) was developed. The model includes two pathways of Fe(III)-DFOB formation, (1) a disjunctive pathway where DFOB binds to unchelated Fe(III) following the dissociation of Fe(III) from Fe(III)-fulvic acid and (2) an adjunctive pathway where Fe(III)-DFOB is formed via the direct association of DFOB with an Fe(III)-fulvic acid complex. Iron binding sites in fulvic acid were classified into two ligand classes on the basis of binding strength. Fitting the kinetic model to experimental observation with a spectrophotometer, the rate constant of ligand exchange for a strong binding site [k_1 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)] was determined to be $k_1 = 4.7 \times 10^3 / [FA]_T + 5.5 \times 10^2$, where $[FA]_T$ ($mg \cdot l^{-1}$) denotes the total fulvic acid concentration. The rate constant for a weak binding site [k_2 ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)] was estimated to be greater than 1×10^5 . The model calculation provided profiles of ligand exchange rate and the amount of Fe(III) bound to each ligand class (relative ratio to total Fe), which are functions of fulvic acid concentration and both of fulvic acid and iron concentrations, respectively.

Key words: iron, Dando fulvic acid, desferrioxamine B, ligand exchange, kinetic model

1. はじめに

鉄はほとんどすべての生物にとって必須な微量栄養素であり、湖沼、沿岸域、海洋など様々な水域で植物プランクトンの主要な生長制限栄養素となっている¹⁻³。水中における鉄の形態は、溶解性の無機第一鉄Fe(II)' (e.g., Fe^{2+} , $Fe(OH)^+$, $Fe(OH)_2$)と第二鉄Fe(III)' (e.g., Fe^{3+} , $FeOH^{2+}$, $Fe(OH)_3$, $Fe(OH)_4^-$), 不溶性の酸化水酸化鉄($FeOOH$), 及び有機態の鉄(Fe(II)-LとFe(III)-L; Lは有機リガンド)に分類される⁴。表層水のようなpHが中性付近で溶存酸素濃度が高い溶液中において卓越する鉄の形態は、溶解性のFe(III)-Lと不溶性の酸化水酸化鉄であり⁵, 溶解性の無機鉄(Fe')の濃度は非常に低い⁶。

自然界中に存在するフルボ酸など多くの有機リガンドは分子量が比較的大きいため($>1,000 \text{ Da}$ ⁷), 植物プランクトンはFe(II)-LやFe(III)-Lをそのままの形態で摂取することができない⁸。一方, Fe'は直接摂取が可能であり, Fe(III)-Lの還元解離反応により生じたFe'は生物利用性が高いことが確認されている。この還元解離反応では, 光により励起された有機リガンドやスーパーオキシド等が鉄

の還元剤として働いている^{9, 10}。また, 多くの藍藻類や一部の真核生物は, 摂取可能な鉄が不足する環境下において, Fe(III)と特異的に親和性のある生体由来有機物(シデロフォア)を細胞外に放出する。Fe(III)-Lとシデロフォアとのリガンド交換反応により形成された鉄シデロフォア錯体は, 細胞表面輸送タンパク質を通して摂取されることが確認されている¹¹⁻¹³。シデロフォアは, 鉄との結合部位としてhydroxamateやcatecholate, α -hydroxycarboxylateなどの官能基を有しており, 鉄に対して非常に高い条件付安定度定数を持つ¹²。

シデロフォアによる鉄摂取が有効であるかどうかは, 有機リガンドに配位しているFe(III)がシデロフォアへと受け渡されるリガンド交換反応速度に依存し, もしその速度が小さければ, シデロフォアは鉄シデロフォア錯体を生成する前に細胞表面近傍から拡散してしまうことになる¹⁴。したがって, シデロフォアによる鉄摂取を議論するためには, リガンド交換反応を反応速度論に基づいたモデルで表現することが求められる。鉄を対象としたリガンド交換速度論の研究は, 著者らの既往の研究を含め, 初期の有機リガンドとしてクエン酸やEDTA, 競合リガンドとして細菌由

* 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻環境水質工学分野 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06

来のシデロフォアや細胞表面タンパク質であるトランスフェリンを用いて行われている¹⁵⁻¹⁷⁾。これらの研究では、リガンド交換反応を、初期の有機錯体(e.g., Fe(III)-L)から金属(Fe(III))が解離し、その遊離金属とシデロフォアが結合する経路(解離反応経路, disjunctive pathway)と、シデロフォアが初期の有機錯体と直接的に結合し、鉄シデロフォア錯体を解離させる経路(会合反応経路, adjunctive pathway)の2つの経路で表現できると報告している(Fig. 1)。

しかしながら、初期の有機リガンドが環境水中のフルボ酸のような不均質な混合物である場合、 Fe(III)-L とシデロフォアとのリガンド交換反応における、これら2つの反応経路に基づいたモデル(Fig. 1)の適用可能性や、モデルから推定された反応速度定数の妥当性に関しては、著者らの知る限り未だ検討されていない。そのため、例えば、VölkerとWolf-Gladrow¹⁸⁾が行った解析では、 Fe(III) シデロフォア錯体が形成される反応の会合反応経路による速度定数に関して、適当な値を想定することで、藻類によるシデロフォア錯体の摂取について論じられている。

フルボ酸は多数のリガンド物質が混合した複合リガンドであるため、金属結合特性にしたがい複数種のリガンドクラス($\text{L}_1, \text{L}_2, \dots$)に分類することで、フルボ酸全体としての特性を良好に表すことができると考えられる。フルボ酸を対象としたリガンド交換反応に関する研究は、自然水中における金属輸送や生物利用、毒性評価の観点から銅、ニッケル、アルミニウム等に関してなされており、解離反応経路と会合反応経路からなるモデルによって説明されてきた^{14, 15, 19)}。これらの研究では、金属親和性に基づきフルボ酸をいくつかのリガンドクラスに分類し、それぞれについての反応速度定数や各リガンドクラスの割合を算出することの重要性が示された。リガンドクラスの比を算出し、リガンド交換反応速度をフルボ酸全濃度ではなく各リガンドクラスに対応させて表現することは、速度論を正確に記述する上できわめて重要である。リガンド交換反応特性はリガンドクラスにより異なり、鉄がそれぞれのリガンドとどの程度錯形成しているかによって、全体としてのリガンド交換反応の効率が変化する。これらの関係を明らかにすることは、シデロフォアによるリガンド交換反応機構の理解や、より汎用性のあるモデルの構築に繋がる。したがって、実環境への適用を考えた場合、各リガンドクラスと金属の結合平衡を捉える必要がある。

本研究では、初期錯体として段戸森林土壌由来フルボ酸(fulvic acid: FA)を、また競合リガンドとして菌類由来シデロフォアであるdesferrioxamine B (DFOB)を用いて、Fig. 1に示したようなフルボ酸鉄錯体とシデロフォアのリガンド交換速度論モデルを構築した。DFOBはhydroxamate基を有する陸生細菌由来のシデロフォアである。hydroxamate基は鉄と強い錯体を形成することが知られており、海水からの検出例も報告されていることから、海水中で鉄と錯体を形成するリガンドとして機能している可能性がある^{20, 21)}。また、DFOBと鉄の錯体は波長430 nm付近の光を吸収するため感度よく測定することができる^{22, 23)}。以上の理由から、シデロフォアの代表としてDFOBを用いた。本研究ではフルボ酸の鉄結合サイトを2つのリガンドクラスに分類し、熱力学的に各リガンドクラスに対する鉄の結合平衡を記述した。そして、リガンド交換反応実験で得た実測データと併せることで、リガンドクラスの割合や鉄との安

Fig. 1 Kinetic model for ligand-exchange between Fe(III) -fulvic acid complex (Fe(III)-L) and desferrioxamine B (DFOB).

定速度定数の比を推定した。また構築されたモデルに基づき、フルボ酸や鉄の濃度が変化する環境でのリガンド交換反応について考察した。

2. 実験方法

2.1 試薬およびストック溶液の作成

フルボ酸は段戸森林土壌由来フルボ酸(日本腐植学会)を使用した。FAを精製水(AQUA PURIFICATE, 大和薬品)に溶解させ、 $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ のFAストック溶液を作成した。本研究では鉄と結合するリガンドとしてのFAのモル濃度($[\text{L}]$)を、FAと結合できる鉄のモル数を用いて表現した。Fujiiら²⁴⁾は過剰の第二鉄が存在する場合(pH 8)に、2 mgの段戸森林土壌由来フルボ酸に445 nmolの鉄が結合したと報告しており、FAの鉄結合容量は $223 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ と考えられる。したがって、作成した $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ のFAストック溶液のリガンド濃度($[\text{L}]$)は220 μM であると仮定した。18 mM硝酸第二鉄溶液($\text{HNO}_3 = 0.2 \text{ M}$, 和光純薬工業)を精製水に加え0.5 mM Fe(III) ストック溶液を作成した。 Fe(III)-FA 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炭酸水素ナトリウム溶液(NaHCO_3 , 関東化学)を使用した。

塩化ナトリウム(NaCl , 関東化学)及び炭酸水素ナトリウム(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。 $\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液のpHは 8.0 ± 0.05 に調整した。競合リガンドであるDFOBのストック溶液は、Desferrioxamine methylate (Sigma)を精製水に250 μM となるよう溶解させることで作成した。 $\text{NaCl}/\text{NaHCO}_3$ 溶液に加えるときにpHが変化するのを避けるため、DFOBストック溶液のpHも 8.0 ± 0.05 に調整した。

以上の試薬、ストック溶液は、使用時以外4℃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の計測には、HM-20 pHメーター(TOK DKK)を使用した。pHの調整には、精製水により希釈した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。

Fe(III)-L 錯体溶液(全鉄濃度14から20 μM , L の全濃度36から96 μM)を、1.5 mlポリプロピレンチューブ内で、0.5 mM Fe(III) ストック溶液12.5 μl と、FAストック溶液($[\text{L}] = 220 \mu\text{M}$) 50 μl から200 μl を混合した後、0.2 Mの重炭酸バッファー溶液250 μl を添加することで用意した。この錯体溶液は、平衡化させるため、使用前に25℃の暗条件で1日静置させた。 Fe(III)-L の平衡定数については、錯形成速度定数

$\geq 4.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ²⁵⁾を解離速度定数 $\leq 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ²⁶⁾で除することにより、 $\geq 2.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と考えられる。この平衡定数による推定から、本研究で採用した濃度条件(全鉄濃度が $\leq 20 \text{ }\mu\text{M}$, Lの全濃度が $\geq 36 \text{ }\mu\text{M}$)においては、ほぼ全ての鉄($\geq 99 \%$)がLと錯体を形成していたと考えられる。

2.2 Fe(III)-DFOB濃度の測定

DFOBはFe(III)と結合することで黄色の錯体を形成し、波長429 nmにおいて最大吸光を示す^{22, 23)}。本研究では、比色分析法と10 cmセル分光器システム(Ocean Optics)を組み合わせることで、分光学的手法により鉄濃度の測定を行った。本手法の検出限界は5 nM程度である。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-2,000 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: 30 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。ベースライン補正にはFe(III)-DFOB錯体が吸光を示さない波長750 nmを用いた。サンプル溶液中におけるFe(III)-DFOB錯体のモル吸光度は $\varepsilon_{429} = 2,800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ であり、既往の文献値²³⁾($\varepsilon_{429} = 2,700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)と同程度を示した。

2.3 リガンド交換反応速度の測定

Fe(III)-L錯体250 nMが存在する溶液にDFOBを全濃度250 nMとなるよう添加し、形成されたFe(III)-DFOB錯体の濃度を分光光度法により測定することにより、リガンド交換反応速度を決定した。リガンド交換反応のサンプル溶液(全鉄濃度250 nM, Lの全濃度0.45から1.8 μM)は、バックグラウンド溶液であるNaCl/NaHCO₃溶液(~25ml)とFe(III)-L錯体溶液を、10 cmシリンジキュベット内で混合して作成した。サンプル溶液をキュベットフォルダーにセットし、FAが波長429 nmにおいて吸光を示すため、吸光度をゼロに設定した。続いて、DFOBストック溶液を加え、キュベットに栓をし、5から10 s手で振り混ぜた後、キュベットをキュベットフォルダーにセットした。添加時から10分間、波長429 nmにおける吸光度を観測した。測定は、Lの全濃度が0.45 μM から1.8 μM の複数の条件の下で計12回行った。実験は25℃の恒温室で行った。

3. リガンド交換速度論モデル

3.1 反応経路を考慮したリガンド交換反応速度定数

リガンド交換速度論モデルの構築の中で、定義した反応速度定数の使用表記をまとめて巻末に示す。

フルボ酸には1分子あたり多数の官能基が存在し、複数分子の鉄と結合すると考えられる。そのため、FAと鉄との錯形成反応は、FA1分子あたりの鉄結合容量をnとして、次のように表すことができる。

しかし、FAには1分子中に異なる強度の結合部位を含むものも存在するため、リガンドクラスを分類するにあたり、FAと鉄の結合を分子単位で捉えるのは適切でない。そこで、Feとの結合強度が異なる複数のFAのリガンドクラス L_i ($i = 1, 2, \dots$)を単位として、FAと鉄1原子の結合を表現する。

また、全てのリガンドクラスを示す場合にはLを用いる

(i.e., $[L] = [L_1] + [L_2] + \dots$)。

Fe(III)-LとDFOBとのリガンド交換反応は、Fig. 1に示す2つの経路によりDFOB鉄錯体(Fe(III)-DFOB)が形成されるものと仮定した。解離反応経路と会合反応経路を考慮した従来のモデルによれば^{17, 27, 28)}、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。

各リガンドクラスについて、Fe(III)- L_i とDFOBとのリガンド交換の全反応は次式で表される。

DFOBとFe(III)'との親和性は高く($\log K_{\text{FeDFOB}} = 12 \text{ M}^{-1}$ ²⁰⁾), Fe(III)-DFOBの解離速度は非常に遅いので、式(3)の逆反応は無視できる。従って、反応速度式は次のように表される。

$$\frac{d[\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]}{dt} = k_i[\text{Fe(III)} - L_i][\text{DFOB}] \quad (4)$$

解離反応経路におけるFe(III)-DFOBの生成反応は、次式で示すように、Fe(III)- L_i が解離した後、Fe(III)-DFOBが形成される。

会合反応経路は、DFOBの会合反応により3元錯体(DFOB-Fe(III)- L_i)を形成した後、その解離によりFe(III)-DFOBを生じる。

Fe(III)-DFOBの解離速度は非常に遅いので、式(6)と式(8)の逆反応は無視した。Fe(III)'は、熱力学的に非常に不安定であるため、FAやDFOBとすぐさま錯形成する(速度定数は 10^5 から $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ オーダー^{22, 29)})。従って、Fe(III)'について定常状態近似することにより、解離反応経路における速度定数 $k_{\text{disj}i}$ は次式で表される(導出の詳細は、付録1を参照)。

$$k_{\text{disj}i} = \frac{k_{d-\text{Fe}L_i}^{\text{disj}} L_i^{\text{disj}}}{k_{f-\text{Fe}L_i}^{\text{disj}} [L_i] + k_{f-\text{FeDFOB}}^{\text{disj}} [\text{DFOB}]} \quad (9)$$

また、会合反応経路における速度定数 $k_{\text{adj}i}$ は従来のモデルと同様にリガンド濃度によらず一定と考えられる^{17, 27, 28)}。全体の反応速度定数 k_i は、これらの経路の速度定数の和として得られる。

$$k_i = k_{\text{disj}i} + k_{\text{adj}i} \quad (10)$$

ここで、式(9)右辺において、 L_i の濃度がFeの濃度よりも非常に高く、分母の第二項が第一項に比べて無視でき($k_{f-\text{Fe}L_i}^{\text{disj}} [L_i] \gg k_{f-\text{FeDFOB}}^{\text{disj}} [\text{DFOB}]$)、かつ、 L_i の全濃度($[L_i]_T$)がFeの全濃度($[\text{Fe}]_T$)よりも十分大きく(i.e., $[L_i]_T \gg [\text{Fe}]_T$)、Feと錯形成していない L_i の濃度($[L_i]$)が L_i の全濃度とほぼ等しい(i.e., $[L_i]_T \approx [L_i]$)場合、次式を得る。

$$k_{\text{disj}i} \approx \frac{k_{d-\text{Fe}L_i}^{\text{disj}} L_i^{\text{disj}}}{k_{f-\text{Fe}L_i}^{\text{disj}} [L_i]_T} = k_{\text{disj-slope}i} \frac{1}{[L_i]_T} \quad (11)$$

以上より、 k_i は $[L_i]_T$ の逆数に関する線形一次式として

表現される。

$$k_i = k_{\text{disj-slopei}} \frac{1}{[L_i]_T} + k_{\text{adi}} \quad (12)$$

ここで、

$$k_{\text{disj-slopei}} = \frac{k_{\text{d-FeL}_i}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}}}{k_{\text{f-FeL}_i}^{\text{disj}}} \quad (13)$$

3.2 速度定数の算出

Fe(III)-DFOBは、式(4)で表されるように複数のFe(III)-L_i錯体とDFOBとのリガンド交換反応により生じる。従って、その生成速度は各リガンドクラスの反応速度の和で表される。

$$\frac{d[\text{Fe(III)-DFOB}]}{dt} = \sum_i (k_i [\text{Fe(III)-L}_i][\text{DFOB}]) \quad (14)$$

ここで、 k_i は各Fe(III)-L_i(Fe(III)-L)と[DFOB]とのリガンド交換反応によりFe(III)-DFOBが生成される速度定数(M⁻¹・s⁻¹)を表す。Fe(III)-DFOB濃度の観測結果は、複数のリガンドクラスに結合しているFe(III)の解離によるものである。しかし、結合強度の低いリガンドクラスに結合しているFe(III)はリガンド交換反応が即座に完了し、その後のFe(III)-DFOBの生成に寄与しない。このような場合を考えると、ある一定時間後に測定されるリガンド交換反応には、鉄との結合強度が最も高いリガンドクラスの錯体(Fe(III)-L₁)のみが関与していると考えられ、以下のように速度定数 k_1 が算出される。

$$\frac{d[\text{Fe(III)-DFOB}]}{dt} = k_1 [\text{Fe(III)-L}_1][\text{DFOB}] \quad (15)$$

Fe(III)-DFOB生成実験において、中間生成物であるFe(III)'とDFOB-Fe(III)-Lは反応性が高く、その濃度は極めて低いと考えられるので、 $[\text{Fe}]_T = [\text{Fe(III)-L}] + [\text{Fe(III)-DFOB}] + [\text{Fe(III)'}] + [\text{DFOB-Fe(III)-L}] \approx [\text{Fe(III)-L}] + [\text{Fe(III)-DFOB}]$ と近似できる。これより、 $[\text{Fe(III)-L}] \approx [\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-DFOB}]$ および $[\text{DFOB}] = [\text{DFOB}]_T - [\text{Fe(III)-DFOB}]$ が成り立つ([DFOB]_TはDFOBの全濃度を表す)。さらに、いずれの実験条件においても $[\text{Fe}]_T = [\text{DFOB}]_T (= 250 \text{ nM})$ としてあるので、Fe(III)-DFOB生成速度は以下のように表される。

$$\frac{d[\text{Fe(III)-DFOB}]}{dt} = k_1 ([\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-DFOB}])^2 \quad (16)$$

$t = 1$ にて $[\text{Fe(III)-DFOB}]_1$ とし、これを積分することで、次式が得られる。

$$\frac{1}{[\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-DFOB}]} - \frac{1}{[\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-DFOB}]_1} = k_1(t-1) \quad (17)$$

観測されるリガンド交換反応に、単一のリガンドクラスのみが寄与している場合、式(17)の左辺と時間 t の散布図を描くことで、回帰直線の傾きを求めることにより k_1 を得た。モデルの実験値へのフィッティングは最小二乗法を用いた。

3.3 FAのリガンドクラスの分類とそれらの割合

フルボ酸鉄錯体全体(Fe(III)-L)とDFOBとのリガンド交換反応を記述するためには、リガンド交換反応速度の他に、各リガンドクラスと鉄との結合平衡を熱力学的に示す必要がある。後述するように、本研究では、FA全体が2つのリガンドクラス(i.e., Feとの結合強度が高いリガンド:L₁と低いリガンド:L₂)からなると考えることによって実験結果を良好に説明することができた。そして、それらがFA全体

に占める割合と鉄結合平衡を解析した。

本研究において、リガンド交換反応速度定数の測定に使用したFe(III)-L錯体は、予め重炭酸バッファー中で1日平衡化された。バッファー中での鉄とリガンドL₁, L₂の平衡は、次式で表される。

式(18), (19)に示した化学種の平衡濃度は、リガンド交換反応開始直前の濃度と等しいため、それぞれ下付き添え字0で示した。

重炭酸バッファー中での平衡反応において、Fe(III)がL₁またはL₂と結合している割合は、Fe(III)とフルボ酸の濃度比に依存する。この依存性と、式(18)と(19)に示した平衡式の関係から、全リガンドLに対するL₁, L₂の比、および K_1 と K_2 の比を算出することが可能である。式(18), (19)を $[\text{Fe(III)'}]_0$ について整理すると、式(20)を得る。

$$\frac{[\text{L}_1]_0}{[\text{Fe(III)-L}_1]_0} K_1 = \frac{[\text{L}_2]_0}{[\text{Fe(III)-L}_2]_0} K_2 \quad (20)$$

ここで、リガンド種L₁, L₂について、それらの全濃度を $[\text{L}_1]_T$, $[\text{L}_2]_T$ とする(e.g., $[\text{L}_1]_T = [\text{L}_1]_0 + [\text{Fe(III)-L}_1]_0$)。また、 $[\text{L}]_T$ に占める $[\text{L}_1]_T$ の割合を定数 α で表すと(i.e., $[\text{L}_1]_T = \alpha [\text{L}]_T$, $[\text{L}_2]_T = (1-\alpha) [\text{L}]_T$)、次式が成り立つ。

$$[\text{L}_1]_0 = \alpha [\text{L}]_T - [\text{Fe(III)-L}_1]_0 \quad (21)$$

$$[\text{L}_2]_0 = (1-\alpha) [\text{L}]_T - [\text{Fe(III)-L}_2]_0 \quad (22)$$

式(20)に式(21)と(22)を代入し、整理すると、式(23)を得る。

$$\alpha [\text{L}]_T \frac{[\text{Fe(III)-L}_2]_0}{[\text{Fe(III)-L}_1]_0} - (1-\alpha) [\text{L}]_T \frac{K_2}{K_1} = \left(1 - \frac{K_2}{K_1}\right) [\text{Fe(III)-L}_2]_0 \quad (23)$$

$\alpha [\text{L}]_T$ で片々割って、整理すると、

$$\frac{[\text{Fe(III)-L}_2]_0}{[\text{Fe(III)-L}_1]_0} = \frac{\left(1 - \frac{K_2}{K_1}\right) [\text{Fe(III)-L}_2]_0}{\alpha} \frac{1}{[\text{L}]_T} + \frac{(1-\alpha) K_2}{\alpha K_1} \quad (24)$$

式(24)は、横軸に $[\text{Fe(III)-L}_2]_0/[\text{L}]_T$ 、縦軸に $[\text{Fe(III)-L}_2]_0/[\text{Fe(III)-L}_1]_0$ をとったグラフの傾きと切片から α および K_2/K_1 が求まることを示す。 $[\text{L}]_T$ は全FA濃度であり、実験条件から決定される(0.45-1.8 μM)。仮に、 $[\text{Fe(III)-L}_2]_0$ が既知であるとする、 $[\text{Fe(III)-L}_1]_0$ は、 $[\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-L}_2]_0$ により得られる(後述するように、 $[\text{Fe(III)-L}_2]_0$ はFe(III)-L₁のリガンド交換反応のみが生じている観測データを反応開始時へ外挿することで算出される)。

4. 結果と考察

4.1 FAのリガンドクラスの分類とそれらの割合

Fig. 2に、観察されたFe(III)-DFOB生成反応の例を示す。溶液を攪拌しキュベットフォルダーにセットする操作によって、100 sまでの測定吸光度にノイズが見られた。式(17)が適用可能となる時間を調べたところ、全てのFA濃度条件において、反応開始から約100 s以降に観察されたFe(III)-DFOB濃度の経時変化に対して式(17)が適用可能であった(Fig. 2)。このことより、反応開始から約100 s以降において、反応には鉄との親和性が最も高いリガンドクラスの錯体(Fe(III)-L₁)のみが関与していたと考えられる。また、100 s以降の結果に式(17)を適用することで計算される

Fig.2 The time courses of Fe(III)-DFOB complex formation under selected experimental conditions. The DFOB stock was added at $t = 0$ to the NaCl/NaHCO₃ solution containing Fe(III)-FA. The symbols and lines indicate experimental data and model fit, respectively. Stable increase in Fe(III)-DFOB concentration was obtained after 100s.

Fe(III)-DFOB濃度の時間変化を反応開始時間 $t = 0$ sへ外挿し、初期Fe(III)-DFOB濃度を算出したところ、ゼロよりも高い値が得られた(**Fig. 2**)。したがって、一部のリガンドクラスと鉄の錯体は、100 sまでの間にリガンド交換反応がほとんど全て完了したと考えられる。反応開始時間 $t = 0$ sへの外挿により得られた初期Fe(III)-DFOB濃度は、弱いリガンドに結合していたFe(III)濃度に相当すると考えられる。このように反応開始後速やかに生成されるFe(III)-DFOB錯体は、Faller とNick²³⁾ やBatesら³⁰⁾によるFe(III)-citrate錯体を用いた実験においても観察されている。Batesらは、重炭酸イオンの存在により、反応性の高いFe(III)-citrate錯体が生じることを報告している。citrateは、フルボ酸中の弱いリガンドの代表的なモデルである²⁹⁾。従って、本実験においても、弱いリガンドクラスに結合したFe(III)はDFOBに対して反応性が高かったと考えられる。

以上のように、フルボ酸-鉄の錯形成において、リガンドクラスを二つに分けるモデルを考えることによって、実験結果を良好に説明できることが示された。FAについて、DFOB添加から100 s以内にFe(III)-L錯体からFe(III)-DFOBへのリガンド交換反応がほとんど完了したりガンドを弱いリガンド L_2 (i.e., 初期Fe(III)-DFOB濃度 = $[\text{Fe(III)-}L_2]_0$)、DFOB添加100 s以降もリガンド交換反応が観察されたりガンドを強いリガンド L_1 (i.e., $[\text{Fe(III)-}L_1]_0 = [\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-}L_2]_0$)として分類した。本研究で行った様々なFA濃度条件の下で、全Fe濃度に対して7%から35%の $[\text{Fe(III)-}L_2]_0$ が得られた。

Fig. 3に、様々なFeとFAの濃度比における $[\text{Fe(III)-}L_2]_0/[L]_T$ と $[\text{Fe(III)-}L_2]_0/[\text{Fe(III)-}L_1]_0$ の関係を示した。式(24)で予想されたように、これらの関係は、一定の傾きと切片を持つ直線で近似することができた($p < 0.001$)。得られた傾き(2.5)と切片(0.060)から、リガンド総量に対する強いリガンド L_1 の割合が $\alpha = 0.39$ 、弱いリガンド L_2 と強いリガンド L_1 のFe(III)との平衡定数の比が $K_2/K_1 = 0.039$ と算出された。

4.2 リガンド交換速度論

Fe(III)-FAとDFOBのリガンド交換速度論モデル(式(12))で示されたように、各FAの濃度条件でリガンド交換反応速度を測定し、縦軸に全体反応速度定数 k_1 、横軸に L_1 全濃度の逆数 $1/[L_1]_T$ をとると、それらの間には有意な正の線形関係($p < 0.001$)が得られた (**Fig. 4**)。これは、式(11)の導出過

Fig.3 Relationship between $[\text{Fe(III)-}L_2]_0/[L]_T$ and $[\text{Fe(III)-}L_2]_0/[\text{Fe(III)-}L_1]_0$. The symbols and line represent experimental data and regression line, respectively.

Fig.4 Relationship between reciprocal of $[L_1]_T$ and overall rate constants (k_1). The symbols and line represent experimental data and linear regression line, respectively.

程における近似が妥当であったことを示す。この直線の傾きと切片から、Fe(III)- L_1 とDFOBのリガンド交換反応における $k_{\text{disj-slope1}}$ と k_{adj1} は、それぞれ $4.1 (\pm 0.5) \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 、 $5.5 (\pm 2.0) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と算出された。従って、全反応速度定数 k_1 は、 L_1 の濃度の関数として、 $k_1 = (4.1 \times 10^4 / [L_1]_T + 5.5 \times 10^2) \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と表された。Fe(III)- L_2 濃度は、最大で全Fe(III)-FA濃度(= 250 nM)の35% (i.e., $[\text{Fe(III)-}L_2]_0 \leq 87.5 \text{ nM}$)であったので、Fe(III)- L_2 とDFOBのリガンド交換反応について反応開始後100sで90%以上の反応が完了していたと仮定すると、その反応速度定数は $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 以上と推定された(反応速度定数の算出は付録2に示した)。

本研究では、リガンドクラス比 α を推定したことより、リガンドクラス自体の濃度に対応する速度定数を算出することが可能となった。また、既往の研究でなされてきたようなフルボ酸全濃度($[\text{FA}]_T(\text{mg} \cdot \text{l}^{-1})$)に対応する値も容易に算出され、 $[L_1] = \alpha[L] = 0.39[L] = 0.39 \times 220 \times 10^{-9} [\text{FA}]$ から、 $k_1 = (4.7 \times 10^3 / [\text{FA}]_T + 5.5 \times 10^2) \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と表された。

4.3 リガンド交換反応に影響を及ぼす因子

強いリガンドクラスおよび弱いリガンドクラスに結合しているFe(III)の割合は、FA濃度や全鉄濃度により決定される(式(18)と(19))。そして、リガンド交換反応の効率は、この割合やFA濃度に影響を受ける。これを定量的に示すため、構築されたモデルによりFA濃度や全鉄濃度が各リガンドに結合するFe(III)の割合やリガンド交換反応に及ぼす影響を調べた。

算出された $\alpha = 0.39$ 、 $K_1/K_2 = 0.039$ を用いると、弱いリガンドクラス L_2 に結合しているFe(III)の割合は、各FAやFeの濃度条件によって**Fig. 5**のように変化する($[\text{Fe(III)-}L_2]_0$ は式(24)に $[\text{Fe(III)-}L_1]_0 = [\text{Fe}]_T - [\text{Fe(III)-}L_2]_0$ を代入することで算

Fig. 5 Relation between $[L]_T$ and $[Fe(III)-L_2]$ relative to total Fe in the range of typical concentrations of total Fe (1 nM - 5 μ M) and total ligand (0.1 - 10 μ M) in natural waters.

出した)。 $[Fe]_T$ に占める $Fe(III)-L_2$ の割合はリガンドとFeの比 $([L]_T / [Fe]_T)$ に依存し、この比が高くなるとFeへの親和性が高い L_1 の割合が大きくなり、一方で $Fe(III)-L_2$ の割合は低下する。

続いて、強いリガンド L_1 についてその濃度 $[L_1]_T$ とリガンド交換反応速度の関係をFig. 6に示した。式(11)、(12)で示したとおり、全反応速度定数(k_1)と解離反応経路による反応速度定数(k_{disj1})は $[L_1]_T$ に依存し、一方、会合反応経路による速度定数(k_{adj1})は $[L_1]_T$ によらず一定となる。式(12)により示されるように、FA濃度が高くなるに従い k_1 は k_{adj1} に漸近する。また、 $[L_1]_T \geq 0.74 \mu M$ になると、解離反応経路によるリガンド交換反応の寄与は、会合反応経路よりも低くなる(i.e., $k_{disj1} < k_{adj1}$)。これは $[L_1]_T$ が増加することで、解離反応経路において解離した $Fe(III)$ からの $Fe(III)-L_1$ の再形成反応(式(5)の逆反応)の速度が増大するためである。逆にFA濃度が低くなると、 $Fe(III)-L_1$ の再形成反応が遅くなり、解離反応経路によるリガンド交換反応速度定数(k_{disj1})が上昇する。弱いリガンドクラスについては、そのリガンド交換反応の経時変化を観測することができなかったため、反応速度を $[L_2]_T$ の関数として示すことができなかった。しかし、強いリガンドと同様、そのリガンド交換メカニズムとその速度定数はリガンド濃度に依存すると予想される。

4.4 自然水中における有機鉄とシデロフォアのリガンド交換反応についての考察

リガンド交換反応は、前節で述べたように、フルボ酸濃度が低いほど速くなる。しかし、フルボ酸濃度が低い環境においては、フルボ酸第二鉄錯体の再形成反応速度は低下し、解離した $Fe(III)$ は安定な酸化水酸化鉄を形成する方向に反応が進みやすくなる²⁶⁾。そのため、自然水中におけるシデロフォアによる鉄摂取は、酸化水酸化鉄としての鉄の沈殿が適切に抑えられる程度で、フルボ酸などの鉄結合リガンドが存在する場合に最も効率的に行われると考えられる。

Thurman³¹⁾は各水域の溶存有機物質濃度の違いについてまとめている。一般的に、最もDOC濃度の低い水域は海域で、DOC濃度の平均は約 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ である。反対に最もDOC濃度の高い水域は湿地で、DOC濃度は10 から $60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とされる。河川や湖におけるDOC濃度は一般的に2から $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ であるが、清浄な河川では1から $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 程度とされる。RitchieとPerdue³²⁾は国際腐植物質学会のフルボ酸標準試料の炭素含有率は50から53%と報告しており、Thurman³¹⁾は

Fig. 6 Effect of $[L_1]_T$ on k_1 for $Fe(III)-L_1$ complex. Solid line, dashed line and dashed-dotted line indicate k_1 , k_{disj1} and k_{adj1} , respectively. The approximation used in the model (i.e., eq. 9 to 11) is applicable when $[DFOB]_T$ and $[Fe]_T$ are larger than $1.4[L_1]_T$.

DOMに占めるフルボ酸の割合は40から50 %と報告している。このデータを元に、自然水中におけるフルボ酸濃度は、 $0.5 / 0.53 \times 0.40 = 0.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ($[L]_T = 0.1 \mu M$, $[L_1]_T = 0.04 \mu M$)から $60 / 0.50 \times 0.50 = 60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ($[L]_T = 10 \mu M$, $[L_1]_T = 5 \mu M$)の範囲で変化すると考えられる。それぞれの水域でシデロフォアによるリガンド交換反応が生じていると仮定した場合、フルボ酸濃度の低い海水中においては、リガンド交換反応のほとんどすべてが解離反応経路によって生じると考えられる(Fig. 6)。反対に、フルボ酸濃度が非常に高い湿地においては、リガンド交換反応のほとんどすべてが会合反応経路によって生じると考えられる。湿地であっても、DOC濃度が $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ($[L]_T = 0.9 \mu M$)と低い環境においては、全体の反応速度定数に対して解離反応経路と会合反応経路の寄与は同程度と考えられる。フルボ酸の弱いリガンドに対しては、リガンド交換反応が即座に完了した。BrulandとRue⁴⁾は、一般的な河川における鉄濃度は $1 \mu M$ から $25 \mu M$ 程度であり、海洋における表層水中の溶存鉄濃度は 20 pM から 1 nM 程度と報告している。従って、河川水中 ($[L]_T = 2$ から $10 \mu M$, $[Fe]_T = 1 \mu M$ から $25 \mu M$)においては、フルボ酸濃度が高く鉄濃度が低い環境では、弱いリガンドクラスと錯形成している鉄の割合は、フルボ酸鉄錯体全体の10 %程度であるが、フルボ酸濃度が低い、または鉄濃度が高い環境では、弱いリガンドクラスと錯形成している鉄の割合が高くなり(Fig. 5)、リガンド交換反応が非常に速く進行する可能性が示唆された。海洋 ($[L]_T = 0.1 \mu M$, $[Fe]_T = 20 \text{ pM}$ から 1 nM)の場合、フルボ酸濃度に対して鉄濃度が非常に低いため、強いリガンドによる鉄錯体の反応性が重要な位置を占めると考えられる。

環境中の海水には Mg^{2+} や Ca^{2+} をはじめとしたFe以外の金属が豊富に含まれる。これらの金属はリガンドと錯形成することでリガンド交換反応速度定数を変化させることが報告されている。本研究に用いたFAに関して、Fujiiら²⁵⁾は、二価金属が存在することで、 $Fe(III)-L$ 錯体が形成される反応(式(5)の逆反応)が抑制されることを報告している。二価金属によるこの効果は、解離反応経路によるリガンド交換反応速度定数(k_{disj1})の上昇につながると考えられる。しかしながら、 $Fe(III)-L$ 錯体が解離する反応(式(5)の正反応)や会合反応経路によるリガンド交換反応速度定数(k_{adj1})への二価金属の影響は未知であり、沿岸域におけるリガンド交換速度論を正確に議論するためには、二価金属の影響

を調べていくことは重要であると考えられる。また、フルボ酸の鉄との錯形成能はpHにより影響を受けるため、pHが異なる水域ではリガンド交換反応速度が変化すると考えられる²⁷⁾。本研究では、ナトリウム以外の金属を含まないpH 8.0の人工溶液中で反応を観測した。この単純化された系においては、リガンド交換反応の基礎的な反応機構を良好に表すことができ、さらに、実環境中におけるフルボ酸や鉄の濃度変化がリガンド交換反応速度定数に大きく影響を及ぼしている可能性が示された。今後、実際の水環境中での植物プランクトンによる鉄摂取形態を詳細に議論するためには、二価金属や微量金属、pH、イオン強度等の影響、さらには実水域におけるシデロフォアの存在量を調べていくことが必要となる。

5. ま と め

本研究では、フルボ酸第二鉄錯体(Fe(III)-FA)とシデロフォアであるdesferrioxamine B (DFOB) のリガンド交換速度論に関して、Fe(III)-フルボ酸錯体からFe(III)'が解離し、そのFe(III)'とシデロフォアが結合する解離反応経路と、シデロフォアが直接的に結合し、錯体を解離させる会合反応経路を考慮した速度論モデル(Fig. 1)を構築した。この速度論モデルによって、実験で観察されたりガンド交換反応速度定数が良好に表現されたことから、モデルが妥当であることが示された。FAと鉄との結合については、結合強度に基づいてFAを2つのリガンドクラスに分類し、平衡論により良好に解析することができた。

速度論モデルから、解離反応経路では、FA濃度が減少するとリガンド交換反応速度定数が上昇することが示された。一方、会合反応経路によるリガンド交換反応速度定数は、FAの濃度に依存せず一定であった。FAの強いリガンドクラスについての全反応速度定数 k_1 は、フルボ酸全濃度([FA]_T(mg·l⁻¹))の関数として、 $k_1 = (4.7 \times 10^3 / [\text{FA}]_T + 5.5 \times 10^2) \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と算出された。また、FAの弱いリガンドクラスについての全反応速度定数は $\geq 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と算出された。

構築された平衡モデルと速度論モデルを用いて、鉄の各リガンドクラスに対する結合の割合と、強いリガンドクラスの鉄錯体からのリガンド交換反応速度を計算することで、自然水中で想定される鉄およびフルボ酸濃度条件における全体的なりガンド交換反応速度の変化について考察した。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会二国間交流事業共同研究「沿岸域における藻類の鉄摂取機構解明」(研究代表者：大村達夫)及び日本学術振興会特別研究員奨励費(19・3731)(研究代表者：藤井学)の援助を受けて行われたことを記して謝意を表する。

(原稿受付 2009年2月9日)

(原稿受理 2009年9月15日)

本研究にて用いた反応速度定数の定義

- k_1 : Fe(III)-L_i と DFOB によるリガンド交換反応について全反応に対応する速度定数(M⁻¹・s⁻¹)
- k_{disj} : 解離反応経路における Fe(III)-L_i と DFOB のリガンド交換反応速度定数(M⁻¹・s⁻¹)

- k_{adj} : 会合反応経路における Fe(III)-L_i と DFOB のリガンド交換反応速度定数(M⁻¹・s⁻¹)
- $k_{\text{d-FeL}_i}^{\text{disj}}$: 解離反応経路における Fe(III)-L_i の解離速度定数(s⁻¹)
- $k_{\text{f-FeL}_i}^{\text{disj}}$: 解離反応経路における Fe(III)' と L_i の錯形成速度定数(M⁻¹・s⁻¹)
- $k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}}$: 解離反応経路における Fe(III)' と DFOB の錯形成速度定数(M⁻¹・s⁻¹)
- $k_{\text{disj-slope}_i}$: $k_{\text{d-FeL}_i}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}} / k_{\text{f-FeL}_i}^{\text{disj}}$

付録1 k_{disj} の導出

式(5)、式(6)のFe(III)'について定常状態近似する。すなわち、次式のように、微小時間におけるFe(III)'の濃度変化を0と近似する。

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Fe(III)'}]}{dt} &= k_{\text{d-FeL}_i}^{\text{disj}} [\text{Fe(III)} - \text{L}_i] \\ &\quad - k_{\text{f-FeL}_i}^{\text{disj}} [\text{Fe(III)'}] [\text{L}_i] \\ &\quad - k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}} [\text{Fe(III)'}] [\text{DFOB}] \\ &= 0 \end{aligned} \quad (1-1)$$

$$[\text{Fe(III)'}] = \frac{k_{\text{d-FeL}_i}^{\text{disj}} [\text{Fe(III)} - \text{L}_i]}{k_{\text{f-FeL}_i}^{\text{disj}} [\text{L}_i] + k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}} [\text{DFOB}]} \quad (1-2)$$

式(6)よりFe(III)-DFOB生成速度は次式で表される。

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]}{dt} &= k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}} [\text{Fe(III)'}] [\text{DFOB}] \\ &= \frac{k_{\text{d-FeL}_i}^{\text{disj}} k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}}}{k_{\text{f-FeL}_i}^{\text{disj}} [\text{L}_i] + k_{\text{f-FeDFOB}}^{\text{disj}} [\text{DFOB}]} [\text{Fe(III)} - \text{L}_i] [\text{DFOB}] \end{aligned} \quad (1-3)$$

これと式(4)との比較より、 k_{disj} は式(9)により表される。

付録2 Fe(III)-L₂とDFOBのリガンド交換反応速度定数の導出

Fe(III)-L₂とDFOBのリガンド交換反応は、Fe(III)-L₁とDFOBのリガンド交換反応と比較して、非常に速やかに進行した。したがって、リガンド交換反応開始から100 sまでの間におけるFe(III)-L₁からのリガンド交換反応を無視し、 $[\text{Fe(III)} - \text{L}_2] = [\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0 - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]$ 、 $[\text{DFOB}] = [\text{DFOB}]_T - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]$ と近似する。これらを式(4)に代入することで次式を得る。

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]}{dt} &= k_2 ([\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0 - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]) \\ &\quad ([\text{DFOB}]_T - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]) \end{aligned} \quad (2-1)$$

$t = 0$ にて $[\text{Fe(III)} - \text{DFOB}] = [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]_0$ とし、これを積分することで、次式が得られる。

$$\begin{aligned} \ln \frac{[\text{DFOB}]_T - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]}{[\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0 - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]} \\ = ([\text{DFOB}]_T - [\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0) k_2 t \\ + \ln \frac{[\text{DFOB}]_T - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]}{[\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0 - [\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]} \end{aligned} \quad (2-2)$$

この式に $[\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0 = 87.5 \text{ nM}$ 、 $[\text{DFOB}]_T = 250 \text{ nM}$ 、 $[\text{Fe(III)} - \text{DFOB}]_0 = 0 \text{ M}$ 、 $t = 100 \text{ s}$ 、 $[\text{Fe(III)} - \text{DFOB}] = 0.90 \times [\text{Fe(III)} - \text{L}_2]_0 = 78.75 \text{ nM}$ を代入することで、 $k_2 = 1.18 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と算出された。

参 考 文 献

- 1) Sunda W. G. and Huntsman S. A. (1995) Iron uptake and growth limitation in oceanic and coastal phytoplankton. *Marine Chemistry*, **50**, 189-206.
- 2) Martin J. H. and Fitzwater S. E. (1998) Iron deficiency limits phytoplankton growth in the northeast Pacific subarctic. *Nature*, **331**, 341-343.
- 3) Nagai T., Imai A., Matsushige K. and Fukushima T. (2006) Effect of iron complexation with dissolved organic matter on the growth of

- cyanobacteria in a eutrophic lake. *Aquatic Microbial Ecology*, **44**, 231-239.
- 4) Bruland K. W. and Rue E. L. (2002) Analytical methods for the determination of concentrations and speciation of iron, in "The Biogeochemistry of Iron in Seawater" (Ed. Turner, D. R., Hunter, K. A.), pp. 255-289, Wiley, New York.
 - 5) Liu X. and Millero F. J. (2002) The solubility of iron in seawater. *Marine Chemistry*, **153**, 255-262.
 - 6) Byrne R. H. and Kester, D. R. (1976) Solubility of hydrous ferric oxide and iron speciation in seawater. *Marine Chemistry*, **4**, 255-274.
 - 7) Tipping E. (2002) Cation Binding by Humic Substances, 434pp., Cambridge University Press, UK.
 - 8) Hudson R. J. M. and Morel F. M. M. (1990) Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cell and medium coordination reactions. *Limnology and Oceanography*, **35**, 1002-1020.
 - 9) Hernandez M. E. and Newman D. K. (2001) Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**, 1562-1571.
 - 10) Rose A. L., Salmon T. P., Lukondeh T., Neilan B. A. and 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.
 - 11) Hutchins, D. A., Witter, A. E., Butler, A. and Luther, G. W. (1999) Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature*, **400**, 858-861.
 - 12) Reid R. T., Live D. H., Faulkner D. J. and Butler A. (1993) A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature*, **366**, 455-458.
 - 13) Wilhelm S. W. and Trick C. G. (1994) Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is common response. *Limnology and Oceanography*, **39**, 1979-1984.
 - 14) Hutchins D. A., Rueter J. G. and Fish W. (1991) Siderophore production and nitrogen fixation are mutually exclusive strategies in *Anabena* 7120. *Limnology and Oceanography*, **36**, 1-12.
 - 15) Stintzi A., Barnes C., Xu J. and Raymond K. N. (2000) Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **97**, 10691-10696.
 - 16) Hoegy F., Celia H., Mislin G. L., Vincent M., Gally J. and Schalk I. J. (2005) Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 20222-20230.
 - 17) 伊藤紘晃, 藤井学, 佐々木史織, Waite T. D., 大村達夫 (2007) 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, 環境工学研究論文集, **44**, 115-125.
 - 18) Völker C. and Wolf-Gladrow D. A. (1999) Physical limits on iron uptake mediated by siderophores or surface reductases. *Marine Chemistry*, **65**, 227-244.
 - 19) Shuman M. S. (1992) Dissociation pathways and species distribution of aluminum bound to an aquatic fulvic acid. *Environmental Science and Technology*, **26**, 593-598.
 - 20) Witter, A. E., Hutchins, D. A., Butler, A. and 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.
 - 21) Macrellis, H. M., Trick, C. G., Rue, E. L., Smith, G. and Bruland, K. W. (2001) Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater. *Marine Chemistry*, **76**, 175-187.
 - 22) Rose, A. L. and Waite, T. D. (2003) Kinetics of hydrolysis and precipitation of ferric iron in seawater. *Environmental Science and Technology*, **37**, 3897-3903.
 - 23) Faller B. and 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 American Chemical Society*, **116**, 3860-3865.
 - 24) Fujii M., Ito H., Rose A. L., Waite T. D. and Omura T. (2008) Transformation dynamics and reactivity of dissolved and colloidal iron in coastal waters. *Marine Chemistry*, **110**, 165-175.
 - 25) Fujii M., Rose A. L., Waite T. D. and Omura T. (2008) Effect of divalent cations on kinetics of Fe(III)-organic ligand complexation in natural waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 1335-1349.
 - 26) Fujii M., Ito H., Rose A. L., Waite T. D. and Omura T. (2008) Superoxide-mediated Fe(II) formation from organically complexed Fe(III) in coastal waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 6079-6089.
 - 27) Hering, J. G. and Morel, F. M. M. (1990) Kinetics of trace metal complexation: ligand-Exchange reactions, *Environmental Science and Technology*, **24**, 242-252.
 - 28) Celo, V., Murimboh, J., Salam, M. S. A. and 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.
 - 29) Rose A. L. and Waite T. D. (2003) Kinetics of Iron complexation by dissolved natural organic matter in coastal waters. *Marine Chemistry*, **84**, 85-103.
 - 30) Bates G. W., Billups C. and Saltman P. (1967) The kinetic and mechanism of iron(III) exchange between chelates and transferring I. The complexes of citrate and nitroacetic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, **242**, 2810-2815.
 - 31) Thurman E. M. (1985) Organic Geochemistry of Natural Waters. Dr W Junk: Boston.
 - 32) Ritchie J. D. and Perdue E. M. (2003) Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **67**, 85-96.