

## 生 體 亜 鉛 觸 媒

Zinc as Bio-Catalyst

森 茂 樹

Shigeki Mori

## 緒 言

動、植物體にはその體構成に必須元素として知られて居る C, H, O, N, P, S, Cl, Ca, Mg, Na 及び K 等の他に極めて微量ではあるが數種の重金属例えば Cu, Fe, Mn, Zn, Al 及び B 其他が含まれて居る。生體に於ける之等の微量元素の存在は一部の學者にはかなり古くより知られていたのであるが、之等が不純物でなくして、夫々生體觸媒として必須不可缺の意義を有するものと認められるようになったのは最近のことに屬する。

Zn に就ても同様であつて、この元素が生體に普遍的に存在して生機上重要な意義をもつものと認められるに至つたのは極めて新しい事柄である。以下 Zn の生體觸媒としての研究の發展及び現況に就て概説して見ようと思う。

## 生體に於ける亜鉛の分布

動物並に植物體に於ける Zn の分布の普遍性及び組織内分布の局在性 (Localization) のあることを最初に指摘して、Zn が必須體成分であることを推定したのは Lechartier & Bellamy (1877) である。その後、動、植物體(主として食品)に於ける Zn の含量は Birekner<sup>1)</sup>, Hiltner & Wichman<sup>2)</sup>, McHargue<sup>3)</sup> 及び Bertrand<sup>4)</sup> 等によつて更に確められ、その分布は一層明かとなつた。就中 Bertrand は蔬菜、菽穀類等合計數十種に上る植物材料につき綿密なる分析を行つたのであるが、その結果の一部を示すと第 1 表の如くで、漿果、根菜類には極めて少く綠葉蔬菜類は之に次ぎ、種實には異常的に多い。

第 1 表

|             |   | 材 料          | 新鮮物 1kg 中<br>Zn mg |
|-------------|---|--------------|--------------------|
| 漿<br>果<br>根 | 果 | 柑橘, メロン, イチゴ | 1 以下               |
|             | 莖 | 人參, 大根, 蕪菁   | 1~2                |
| 軟 白 蔬 菜     |   | 甘藍, 苜蓿       | 1~2                |
|             |   | セルリ, 花椰菜, 洋薺 | 2~3                |
| 綠 葉 蔬 菜     |   | 大根, 菠薐草, 苜蓿  | 4~7                |
| 種 實         |   | 大豆           | 20                 |
|             |   | そば           | 53                 |
|             |   | 麻            | 83                 |
|             |   | 糯米           | 30                 |
|             |   | 精白米          | 2                  |

又種々なる動物材料に就ても同様に Zn の分布、含量が確められたが、一例として人體臓器に就て Eggleton<sup>5)</sup> が定量した結果を示すと第2表の如くである。

第 2 表

| 臓 器             | 大 腦 | 肝 臓 | 腎 臓 | 副 腎 | 脾 臓 | 脾 臓 | 心 臓 | 肺 臓 | 筋 肉 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 乾 燥 物<br>1kg中mg | 43  | 245 | 186 | 82  | 135 | 72  | 100 | 67  | 226 |

尙筆者等<sup>6)</sup> (1932)も嘗て乳汁に關する研究中、乳汁中に Zn が恒成分として存在することを確認し、且つその含量は第3表に示すが如く乳汁中主要なる微量成分として認められていた Fe 及び Cu を遙かに凌駕することを見出し、その生理的意義に就て當時深き疑問を持つた次第である。

第 3 表

|       |     |     | 乳 汁 1 kg 中 |           |           |
|-------|-----|-----|------------|-----------|-----------|
|       |     |     | Fe (mg)    | Cu (mg)   | Zn (mg)   |
| 牛 乳   | 限 平 | 界 均 | 0.20~1.40  | 0.22~1.31 | 0.50~5.18 |
|       |     |     | 0.50       | 0.50      | 2.06      |
| 山 羊 乳 | 限 平 | 界 均 | 0.04~0.28  | 0.45~1.72 | 1.15~7.38 |
|       |     |     | 0.19       | 0.81      | 4.56      |

試験動物各1頭につき、全泌乳期間に於ける平均値を示す。

以上の如く、生體に於ける Zn の分布の普遍性が認められるに至つて、必然的にその生理的意義に就て學者の注目するところとなり、或ひは Zn 缺乏食餌による動物飼育實驗<sup>7)</sup>により、又は人體(正常又は病狀)觀察等により食餌中 Zn の缺乏と Pellagra<sup>8)</sup>、脚氣<sup>9)</sup> その他特定の病狀と關係のあることが指摘されるに至つた。

然るに夫等の研究とは別に、當時胰臟ホルモン Insulin の精製が着々進行し遂に Abel によつて結晶として分離されたのであるが、間もなくこのものは圖らずも含亜鉛蛋白であることが確められ、更に1940年には Keilin & Mann は血液の炭酸排出に關與する酵素 Carbonic Anhydrase は實に含亜鉛酵素であることを確證して以來動物體に於ける Zn の觸媒的意義は明瞭となり、この方面の研究に新生面を劃することとなつた。以下 Insulin 及び Carbonic Anhydrase に就て略述して見よう。

### Insulin に 就 て

周知の如く Insulin は胰臟の内分泌によつて生産されるホルモンで、副腎より生ずる Adrenalin とは拮抗的に作用して血糖量を調節(降下する)する物質である。胰臟の内分泌と糖尿病と重大なる關係のあることを見出したのは Mering & Minkowski (1889) である。糖尿の抑制に對して有効なる物質は胰臟内に點在する細胞群 Langelhans Insel より生産される

ことが明かとなり、この物質に對し Insulin と名づけられるに至つた。Insulin に關する研究はその後、臨床的應用と相俟つて急速に進歩し、その精製法の如きも著名の特許方法をも數えれば20種を下らない。有効物質の製出に初めて成功したのは Banting (1923) で、その後 Abel (1928) は遂に結晶として分離に成功したが、間もなくこのものは含亜鉛蛋白であることが明らかとなつたのである。Insulin に關してその分離、精製、檢定及び臨床的應用方法等に就ては詳細な記載<sup>10)</sup>があるから總べて省略し、以下最近究明された化學的性質並びに生理的意義に就て概略を記述する。

#### a) Insulin の化學的性質

普通の製品は白色、非晶形で、非透性で一般蛋白の反應を示す。水に難溶であるが稀薄なる酸又はアルカリには溶け易い。等電點は pH 5.0 附近、高濃度酒精には不溶であるが、濃度80%までの酒精に溶解する。又食鹽及硫酸等により鹽析され、ピクリン酸、フラビアン酸により沈澱する。Insulin の精製には主として以上の諸性質を組合せて利用し、遂に結晶の分離に到達したわけである。

結晶 Insulin には Zn を含有するが、精製の條件によつてその含量が一致せず、時に甚だ低く<sup>11)</sup>、或は含量の差異の範圍が一定せず、この點が屢々論議の對象となつたが、Cohn 等<sup>12)</sup>は結晶化に及ぼす要件を吟味した結果、第4表に示すが如く pH の影響が決定的であることを明かにした。

第 4 表

| pH     | 5.20 | 5.78 | 6.06 | 6.09 | 6.29 | 6.40 |
|--------|------|------|------|------|------|------|
| Zn (%) | 0.26 | 0.51 | 0.52 | 0.52 | 0.59 | 0.60 |

結晶 Insulin はその單一性及安定性のために從來屢々蛋白の構造研究の對象となり、既に計測された分子量及アミノ酸組成は確定的のものと言ひ得る。

結晶 Insulin のアミノ酸組成は最近の報告<sup>13)</sup>よれば第5表の如くである。

第 5 表

| アミノ酸          | 蛋白 100g 中 g | 分 析 法※ |
|---------------|-------------|--------|
| Glycine       | 4.5         | LM     |
| Valine        | 9.1         | "      |
| Leucine       | 13.0        | "      |
| Isoleucine    | 2.8         | LA     |
| Cystine       | 11.7        | Chem.  |
| Serine        | 6.6         | LM     |
| Threonine     | 3.5         | Chem.  |
| Arginine      | 3.4         | LM     |
| Histidine     | 5.30        | "      |
| Lysine        | 2.4         | "      |
| Phenylalanine | 7.95        | "      |
| Tyrosine      | 12.2        | Chem.  |
| Glutamic acid | 19.9        | LA     |
| Proline       | 2.9         | LM     |

※試料は結晶 Zn-Insulin、分析法は主に微生物檢定法によつた。LA, Lactb. arabinosus, LM, Leuconostoc mesenteroides, Chem. 化學分析

分子量は超遠心分離による測定結果<sup>14)</sup>によると 35,000 である。Insulin 1 分子中 Zn 2 原子を含むと推定されるが、Cohn 等が Zn 含量より計算したところによると Zn 0.31 % のとき 42,200, 0.36 % のとき 37,300 となり、この値は X 線分析や、超遠心分離法により決定された分子量 38,500, 35,100 と大體一致するもので、蛋白として分子量最小のものと言ひ得る。

最近 Sanger<sup>15)</sup> は Performic acid (Formyl hydroperoxide, H.CO.C.OH) を用い Insulin 分子内の -S-S- 結合を巧妙に切斷した結果その Submolecule は分子量 12,000 のものであり、夫等が互に -S-S- 基により結合するものと推定したが、更に Butler 等<sup>16)</sup> は Chymotrypsin その他の酵素を用い分子量 300 又は 500 等の Peptide に切斷し、夫等の末端基の定量を行いアミノ酸の配列を順次決定しつつある。よつて Insulin の構造の全貌が明かとなるのは間近きことと思われるが、Zn の結合の様式に就ては今のところ何等言及されていない。

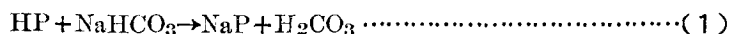
#### b) 生體觸媒としての Insulin

Insulin は酵素としての活性を持たない。且つ内生的である點に於て酵素とは區別されるが生體觸媒としての作用に於て區別はない。Insulin が糖の代謝に於て、その化學反應を如何に觸媒するかと言うことに就ては現在尙明かにされていない。その効力檢定の方法には専ら生體檢定による他なく、特定の化學的方法が見出されて居ないことも反應機構の解明を困難ならしめて居る原因である。常態に於て糖の利用には當然酸化が伴い CO<sub>2</sub> が生成する。糖尿病に於ては糖の酸化が阻害され、酸素の利用率悪く、呼吸係数は低下し、アセトン體（アセトン、アセト酷酸及 B-オキシ酷酸等）を生成することは知られて居る。アセトン體の生成は脂肪代謝とも關係があるから糖尿病の原因は複雑であり、Insulin の關與する反應機構にも不明の點が多いのであるが、同じく含亜鉛蛋白である Carbonic anhydrase と對照して、その化學的性質に多くの類似點のあること、分子量の近接して居ること及兩者ともに炭酸排泄に密接なる關係のあること等に於て互に近縁の關係のあることを豫想せしめるのである。

尙 Insulin と同じく血糖降下性物質は甘藍、萵苣、洋葱及蕪菁等の植物にも存在し、その効用は實際にも利用せられて居るのであるが、有効成分の本體が同じく含亜鉛物質なるや否や興味ある問題である。

### Carbonic anhydrase に就て

Carbonic anhydrase とは  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$  なる反應を觸媒する酵素である。以下この酵素の發見並びに研究の進展について略述して見よう。從來久しき間、生體酸化の結果組織内に生産された CO<sub>2</sub> は主として重炭酸鹽の形で血液に運搬されて肺臟に至り、ここで次の反應に基づいて CO<sub>2</sub> が游離するものと考えられていた。



HP, weak protein acid of blood

NaP, protein salt

然るに Henriques<sup>17)</sup> が實驗したところによると生理的條件に於て、反應(2)に従つて排出される  $\text{CO}_2$  の計算量は實際に呼氣中に測定された  $\text{CO}_2$  量よりも遙かに小であつた。他方血液或いは Hemoglobin は  $\frac{1}{20,000}$  の稀釋度に於てすら、生理的條件に於て(2)式の反應を促進し、 $\text{CO}_2$  の發生を認め得ることが實證された。之等の結果により血液には(2)式の反應を觸媒する物質の存在が豫想されたのであるが、1932年 Meldrum & Roughton<sup>18)</sup> は遂に牛血液よりこの觸媒を白色粉末として分離し Carbonic anhydrase と命名した。尙この製品は  $\frac{1}{10,000,000}$  の濃度に於ても活力が認められたのである。

Carbonic anhydrase に関してはその後 Keilin & Mann<sup>19)</sup> が周密なる注意と努力の下に血液及胃粘膜より高度に精製した製品を分離し、このものが含亜鉛蛋白であることを確めたが、Hove, Elvehjem & Hart<sup>20)</sup> 等も亦之を追試して Keilin 等の實驗を確認した。

Keilin 等の分離した製品は Fe, Mn 及 Cu は皆無又は痕跡で Zn 0.31~0.33%, 活度 (Meldrum & Roughton 式による) 2220, 等電點 (電氣泳動速度より計測) pH 5.0, 分子量 (超遠心分離により) は馬 Hemoglobin の  $\frac{1}{2}$  で約 34,000 と實測された。

この酵素の活性は一般金屬觸媒と同じく KCN,  $\text{H}_2\text{S}$  及  $\text{NaN}_3$  等により完全に阻害されるが、之等を除くことにより可逆的に復活する事實により、明かに活性基が金屬に依存することを示すものである。

Keilin 等の研究に續き Scott<sup>21)</sup> 等は更に精製を試み遂に結晶として分離したが、その結晶化に際し Insulin と同様に高濃度の酒精溶液を用いて目的を達したことは注目すべきことである。

Carbonic anhydrase の動物特に人體に於ける分布はほぼ明かとなつたが、臓器の中で特に多量に含まれて居るのは胃粘膜、又體液中特筆すべきものは赤血球である。前者は胃液の鹽酸生成に重大なる關係があると言はれ、後者は血液の炭酸排泄に直接關係のあることは前述の通りである。血液による  $\text{O}_2$  及  $\text{CO}_2$  の運搬の機作に就ては、從來2—3の假説的な説明があつたが、Carbonic anhydrase の發見により  $\text{CO}_2$  の排出機構は明かとなつたわけである。Keilin 等の研究によれば赤血球に含まれる金屬成分には少くとも第6表に掲げるようなものがあつて之等の觸媒によつて呼吸作用が完遂されるものと見るべきで一聯の反應機構は想像以上に精妙なるものであらう。

第 6 表

| 赤血球中の金屬成分           | 血球 100cc 中含量<br>(乾物として) g | 各成分中の金屬含量<br>% |
|---------------------|---------------------------|----------------|
| Hemoglobin          | 28.00                     | Fe 0.34        |
| Carbonic anhydrase* | 0.21                      | Zn 0.33        |
| Hemocuprein         | 0.06                      | Cu 0.34        |

※血液 1l 中 Carbonic anhydrase 約 1g を含む。又赤血球中 Carbonic anhydrase の濃度は Hemocuprein の 3~4 倍、Hemoglobin の  $\frac{1}{133}$  である。

## 植物の含亜鉛酵素

植物體に於ける Zn の分布の普遍性並びに局在性のあることは既に第 1 表に示した如くであるが、特に綠葉に於て綠色濃厚なる部分には稀薄なる部分と比較して Zn 含量が著しく高いことは嘗て Bertrand<sup>22)</sup> 等が指摘したところであるが、筆者等<sup>23)</sup> も追試して然る事實を確めた。これらの結果によれば Zn は Cu, Fe 及 Mn 等と共に綠色の部分に、即ち葉綠體の分布濃厚なる部分に集積することは確實である。

偕て、植物體に於ける Zn の形態並びに機能は如何なるものか、既に動物體より Carbonic anhydrase が發見されて以來これと同種の酵素が植物に存在するや否やは當然検討さるべき事柄であるばかりでなく、植物の炭酸同化の問題と關聯して極めて重大となつた。植物の光合成に際し、多量に吸収同化される  $\text{CO}_2$  が  $\text{H}_2\text{CO}_3$  の形で利用されるものとすれば、植物體液に溶解した  $\text{CO}_2$  から  $\text{H}_2\text{CO}_3$  が形成される速度は純水中に於ける速度より遙かに大であるべきである。數種の植物に就て Burr<sup>24)</sup> が計測したところによると  $\text{CO}_2$  の Hydration の速度は 100 乃至數千倍に高められることを必要とする。

従つて綠葉中に  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  なる反應を觸媒する酵素の存在が豫想されるわけであるが、實驗の結果かかる酵素の存在が認められなかつたところから、一時は光合成に用いられる炭酸の形態は  $\text{H}_2\text{CO}_3$  ではなくして  $\text{CO}_2$  のままであらうと推論されて居た。然るに最近に至り綠葉中に Carbonic anhydrase の存在を認むべき事實<sup>25)</sup> が報告されるに至つたが、光合成に於て先づ  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  なる過程の存在の確認並びにこの反應に對する觸媒の存在を明かにしなければならない。

筆者等は數年來の研究により植物にも動物の Carbonic anhydrase と同様に重炭酸鹽に作用して  $\text{O}_2$  を發生せしめる觸媒の存在すること、その活度が綠色部（葉綠體の分布するところ）に限られること、精製段階に於て活度と Zn 濃度とが同調すること等により植物の含亜鉛酵素が Carbonic anhydrase と同一又は類似のものであらうと推定した次第である。尙このものは KCN 及  $\text{H}_2\text{S}$  等により阻害されるから活性基が金屬であること、又  $\text{HgCl}_2$  その他 SH 試薬により阻害されるから活性基に SH を持つことも推察出来るのである。

又筆者等の最近の實驗<sup>26)</sup> によれば、分別した酵素の亜鉛含量がかなりの高濃度であるのに拘らず酵素的活度が動物の Carbonic anhydrase と比較して甚だしく弱いことは植物に於けるこの酵素自體の本性によるものか、或いはこの酵素を賦活すべき何物かを必要とするか、又は基質その他反應條件に適正ならざる點があるか、目下究明に努力しつつある。

以上生體に於ける Zn の分布並びにその生體觸媒としての意義に就て略述した。

終りに臨み本稿の校閲を賜つた近藤金助先生に深く感謝する次第である。

(昭和24年3月30日記)

## 文 献

- 1) V. Birekner: J. Biol. Chem., **38**, 191 (1919)

- 2) R. S. Hiltner & H. J. Wichman : J. Biol. Chem., **33**, 205 (1919)
- 3) J. S. McHargue : J. Amer. Soc. Agr., **17**, 363 (1925)
- 4) G. Bertrand & B. Benzon : Compt. rend., **187**, 1093 (1928)
- 5) W. G. E. Feggleton : Biochem. J., **34**, 391 (1940)
- 6) 近藤・森 : 日化 **53**, 1190 (1932)
- 7) R. B. Hubbel & L. B. Mendel : J. Biol. Chem., **75**, 567 (1927)
- 8) E. Hove. C. A. Elvehjem & E. B. Hart : Amer. J. Physiol. **119**, 768 (1937)
- 9) W. G. E. Eggleton : Biochem. J., **33**, 403 (1939)
- 10) J. J. R. Macleod : Kohlenhydratstoffwechsel und Insulin. (1927) Berlin
- 11) M. Sahyn : J. Biol. Chem., **138**, 487 (1941)
- 12) E. J. Cohn et al : J. Amer. Chem. Soc., **63**, 17 (1941)
- 13) S. F. Velick & E. Ronzoni : J. Biol. Chem., **173**, 627 (1943)
- 14) The Svedberg & K. O. Pederson : Die Ultracentrifuge (1940) 368
- 15) F. Sanger : Nature, **163**, 295. 433 (1947)
- 16) J. A. V. Butler et al : Nature. **162**, 418 (1948)
- 17) O. M. Henriques : Biochem. Z., **200** 1 (1928)
- 18) F. J. W. Roughton : Ergebn. d. Enzymf., **3**, 289 (1934)
- 19) D. Keilin & T. Mann : Biochem J., **34**, 1163 (1940)
- 20) E. Hove et al : J. Biol. Chem., **136**, 425 (1940)
- 21) D. A. Scott & J. R. Mendive : J. Biol. Chem., **139**, 661 (1941), D. A. Scott : ibid, **142**, 959 (1942), D. A. Scott & A. M. Fisher : ibid, **144**, 373 (1941)
- 22) G. Bertrand & M. Andreitcheva : Compt. rend., **197**, 1374 (1933)
- 23) 近藤・森 : 本誌 **17**, 78 (1949)
- 24) G. O. Burr : Proc. Roy. Soc., B. **120**, 42 (1936)
- 25) A. C. Neish : Biochem. J., **33**, 300 (1939), J. R. G. Bradfield : Nature **159**, 467 (1947)
- 26) 近藤・森・河合 : 本誌 **18**, 33 (1949)