

体液中のイオンに関する一考察(第3報)

—特にリン酸およびその化合物について……その1—

舟 木 行 雄

A consideration of Ions in the Body fluid (Part 3)

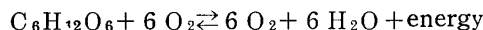
(especially about Phosphoric acid and its compounds—No. 1)

By Yukio Funaki

第1報¹⁾と第2報²⁾では K^+ と Na^+ に関する生物物理化学的なことと、それらの体液中でのありかたについて述べた。本報は、リン酸およびその化合物について述べる。

生体中のリンは種々な形態の化合物で存在しているが、本報では、いわゆを高エネルギー化合物の有機リン酸に触れるにあたって、ここでいうエネルギーの基本的(物理化学的)な概念を伴いながら考察を進める。

生物は食物としての外部物質から定常的にエネルギーを補給することによってのみ生活し、機能することができることは勿論であるが、生体は機械的に温度や圧力を有効な仕事に変えることはできない。したがって、ある化学反応、たとえば



から生ずるエネルギーをなにかに変えて利用している。

ATPが発見され、エネルギーに関与する多くの生体物質が分離同定されているが³⁾、これらの物質の特徴は、動物、植物および微生物の細胞内に広く分布しており、特殊な物理化学的性状をもっていて、それらの物質相互間ないし、エネルギーを必要とする特定の反応にエネルギーを転換している。

エネルギー転換の機構の上から、これらの化合物を生体が作り出す反応機構は、完全な化学単位(たとえばリン酸基)をある化合物から他へ移すことによって、エネルギーを転移している。また、電子ないしプロトンの転移(酸化—還元)に共役してエネルギー転移をおこなっている。

すべての化学反応は、熱力学の法則に支配され、その平衡が定められている。酵素はその平衡を早めるだけの作用をするのであって、エネルギー的には不可能な反応を触媒することはできない。熱力学は単離した系で全ての物事を考えている。そのような系で、反応に変えるエ

ネルギー(F)を自由エネルギーとするが、しかし系には、たとえば分子間および分子内の自由運動などの反応(仕事)に変換され得ないエネルギーがあり、これらのエネルギーは、エントロピー(S)として消費される。したがって、ある系のエネルギーは、反応を促進することのできる自由エネルギーと、仕事には使うことのできないエントロピーと、その和である全エネルギーのエントタルピー(H)とに区別することができる。そこで、反応熱は反応中のHの変化(ΔH)であり、反応生成物のHの和から反応物質のHの和を差引いたものに等しくなる。したがって、発熱反応の ΔH は負に、吸熱反応の ΔH は正になる。また、自由エネルギー変化(ΔF)が正のときは、吸熱反応であり、負のときは発熱反応である。

上記に述べた反応に利用できないエネルギーはSと絶対温度(T)の積(TS)であるが、あの反応前後におけるエントロピー変化(ΔS)は、その反応を不可逆性の指標としている。 ΔS が大きくなるほど大きなエネルギー(T ΔS)が反応に利用度が小さくなって、その反応は不可逆的となり、

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S$$

の関係式が成り立つ。

また、ある反応 $A + B \rightleftharpoons C + D$ において、ある温度における ΔF は定常状態の場合

$$\Delta F = \Delta F^\circ + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

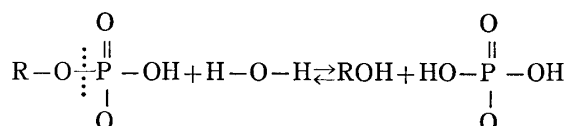
で表わされる。ここで、 ΔF° は標準自由エネルギー変化で、反応の定数である。全ての反応物質が系に単位濃度存在するとき $\Delta F = \Delta F^\circ$ となる。 ΔF は反応物質、反応生成物の量によって無限に変化することは式から明らかで

あるから、 ΔF° を求めておくことが必要となる。反応が平衡に達したとき、反応はどちらにも進行しないから $\Delta F = 0$ となり、濃度の変化は起こらないから、したがって

$$\Delta F^\circ = -RT \ln K_{eq}$$

となる。

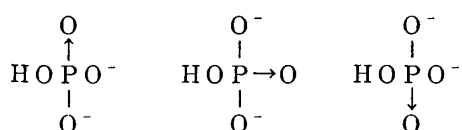
高エネルギーリン酸化合物については、ATP をはじめとして、生体内の有機リン酸化合物は、1920から30年代にかけて研究され、ホスホアルギニン⁴⁾、ホスホエノールピルビン酸⁵⁾ が発見されたが、すでに1863年には、Liebig⁶⁾ はリン酸の重要性を認識していたし、1906年には Harden と Young⁷⁾ はイーストの無細胞抽出液の発酵は無機リン酸から有機リン酸への変換を伴うことを研究している。Meyerhof の各種の有機リン酸化合物の加水分解反応の ΔF と ΔH の測定によると、



加水分解の ΔF° が高く、水溶液中で安定な高エネルギーリン酸化合物の一群があることがわかった。高エネルギー化合物は、あたかもその P-O 結合が加水分解で開裂するさい高エネルギーを生ずるかのようになられていた⁸⁾。しかしこの概念そのものは物理化学の基本法則とは合わないが、高エネルギーリン酸化合物と高エネルギー結合の生成という概念は今後の研究に大きな影響を与えた。

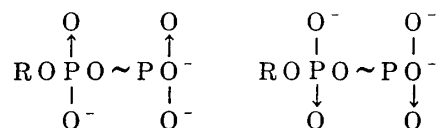
実際には、ある結合の加水分解が高い ΔF° を示すのは、その分子構造全体から由来する多くの独立した因子の結果であると考えられる。一つの因子としては、化合物と分解物の安定性の差であって、もし分解物が化合物よりも安定であるとすれば、 ΔF° は大きく負とならなければならない⁹⁾。

無機リン酸は多く共鳴構造をもちうる。



これは通常のリン酸エステルでも同じことである。しか

しピロリン酸結合では、共鳴構造は縮小されて、

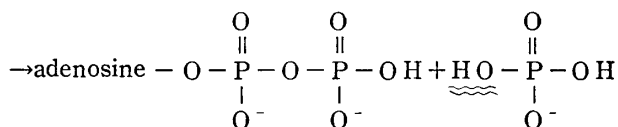
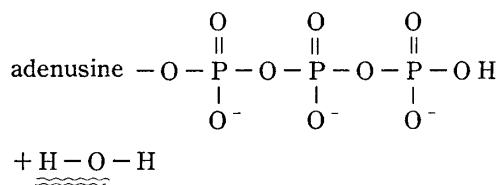


Opposing resonance だけとなる¹⁰⁾。

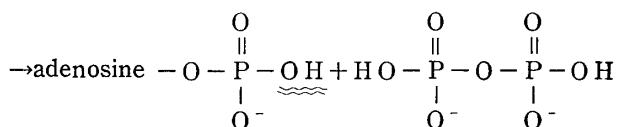
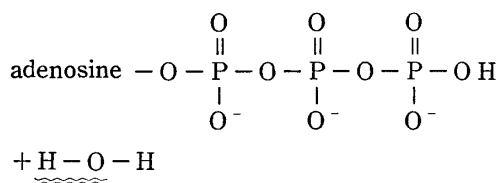
その後、リン酸化合物については、多くの研究者によって解明が進められている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。

次に化学基の転移に伴うエネルギー変換反応に関する重要な物質として、アデノシン、グアノシン、イノシン、シチジンおよびウリジンなどの多リン酸化合物である ATP, ADP, GTP, ITP, IDP, CTP, CDP および UTP, UDP があげられるが、とくにエネルギー変換を伴う ATP の合成、分解には2つの基本的な反応形式が考えられる。

第1は、



第2は、



であり、両者とも水が受容体であると、ATP の加水分解の主たる2つの形式で、それぞれオルトリン酸およびピロリン酸を生ずる。

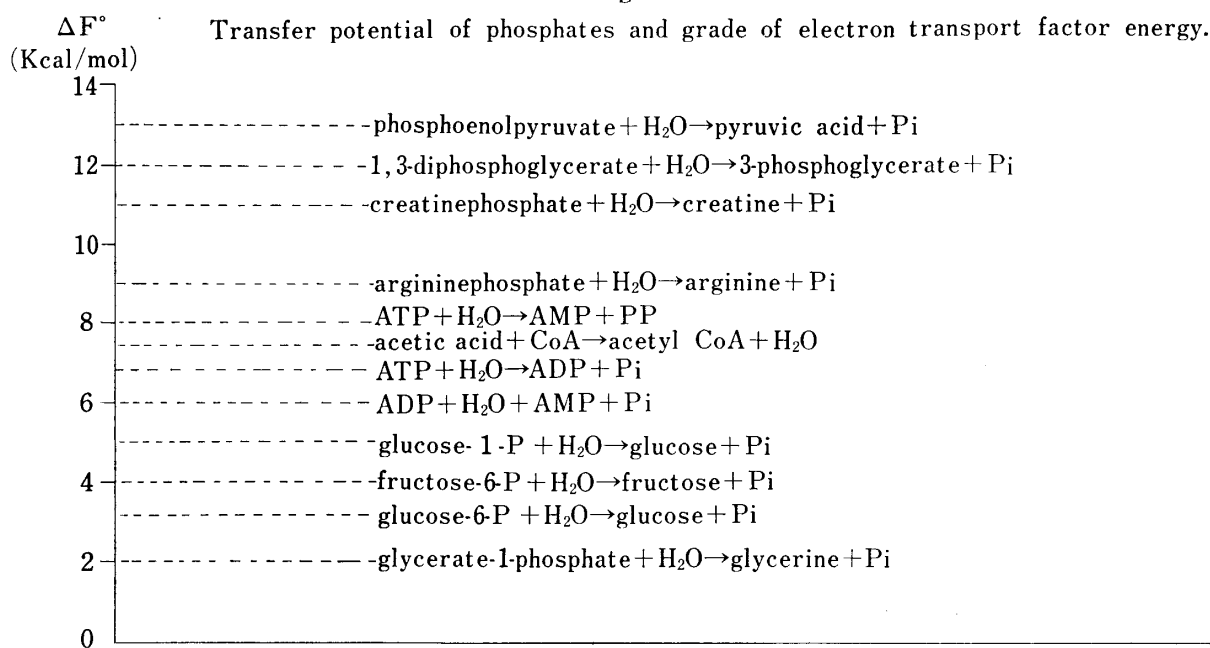
ATP の末端リン酸の加水分解における ΔF° は、最初の測定⁵⁾ では、 $-10 \sim -12$ Kcal/mol とされていたが、その後の研究で、加水分解酵素の種類や Mg^{2+} の存在などの条件によって異なってくることがわかり、pH7.0,

25°C 過剰の Mg^{2+} と微量の酵素の存在という条件で、 $\Delta F^\circ = -7 \text{ Kcal/mol}$ ，という報告もある¹⁴⁾。

加水分解の ΔF° と関連して、ATP がリン酸基を転移すると共にエネルギーを放出することについては、式 1 となり¹⁵⁾，この反応は水がリン酸の最終受容体となるのであるが、加水分解の ΔF° は P_i の ΔF° をゼロレベルとしたときのある有機リン酸化合物とのエネルギー的距

離を示すことになる。高い ΔF° をもつリン酸化合物は F を放出して低い ΔF° をもつそれにリン酸基を移すことが考えられる。Fig-1 はリン酸化合物のリン酸転移ポテンシャルおよび電子伝達因子のエネルギー準位を示して、リン酸のリン酸化合物から水への転移（加水分解）および 1 電子の電子伝達因子から分子状酸素への転移を基底線としている¹⁶⁾。

Fig-1



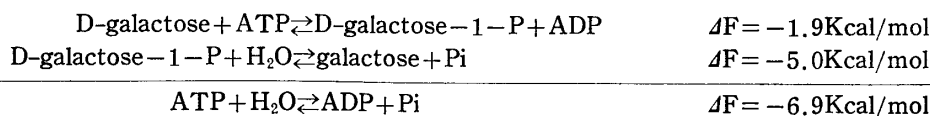
by Atkinson, M.R. & Morton, R.K.¹²⁾ & DuPraw, E.J.¹⁶⁾

このようなリン酸転移ポテンシャル直線上、ATP は中間の位に存在し、エネルギー受容体としても供与体としても働きうる位置にある。たとえば、ホスホエノールピルビン酸 ($\Delta F^\circ = -12.8 \text{ Kcal/mol}$) からリン酸基を受けとり、グルコース-6-リン酸 ($\Delta F^\circ = -3.3 \text{ Kcal/mol}$) などに、リン酸を供す。したがって、この中間的位のゆえに多くのリン酸化反応において、ATP は中間体として関与することができる。また、それらの理由から組織内における ATP 自身の濃度はきわめて低い（骨格筋で

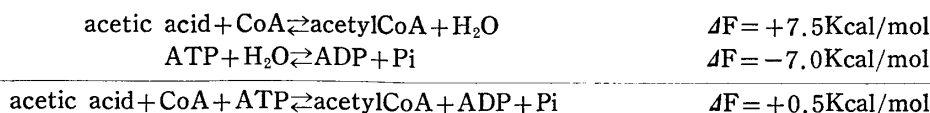
$5 \times 10^{-6} \text{ mol/g}$ ）ことも考え及ぶ。

ATP でリン酸化された化合物は、それによってリン酸基の供与体となり得たので、活性化されたといわれている。リン酸化された化合物が最終的に無機リン酸に加水分解される反応は発熱反応であるから、エネルギー的に可能ないかなる吸熱反応とも共役しうることになる。たとえば、酢酸と CoA の結合はエネルギー的には困難であるが、ATP の加水分解と共役することによって可能となる。

式 1

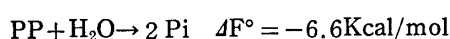


式 2

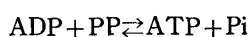


つぎに式2であるが、共役は実際には微生物の場合、酢酸のリン酸化がおり、CoAに渡される形でおこり、式3となる。

ATP加水分解の他の方法は、オルトリン酸の代りにピロリン酸(PP)を生ずるもので、この ΔF° は約-8 Kcal/molと示されている。この反応は、蛋白、RNA、NAD、FADなどの生物的に重要な物質の生合成の場合にみられる。動物の場合のアセチルCoAの合成は、下記式4であり、酢酸のアデニル化反応の結果生ずるピロリン酸は、それ自体高い加水分解の ΔF° をもっている。

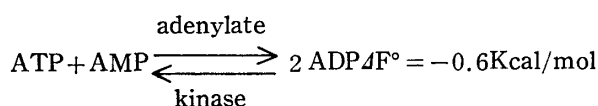


このエネルギーは、ある系によってATP再合成に使われる。



実際、微生物はPPとアセチルリン酸をリン酸基の貯蔵物質として使用している。

ADPの末端リン酸基も他の化合物に渡されてリン酸化することができる。たとえば、



この反応の ΔF° からADP末端リン酸基の加水分解の ΔF° は $-7.0 + 0.6 = -6.4 \text{ Kcal/mol}$ と計算されている¹⁴⁾。

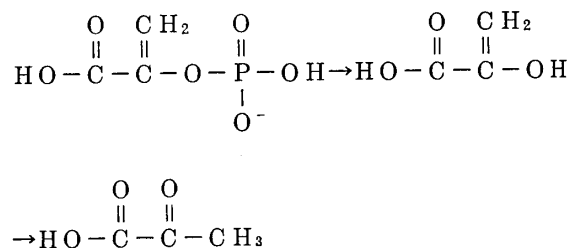
また、ホスホエノールピルビン酸は天然のリン酸化化合物中最も高い ΔF° をもっており(Fig-1)、その高い ΔF° を与える原因がATPやカルボキシリン酸とは異った機構をもっている。

ホスホエノールピルビン酸を発酵のさい重要な中間体として単離し、その ΔF° が高いことを次の反応の ΔF から測定された結果、 ΔF は Mg^{2+} の存在下で約-5.3 Kcal

/molとなっている¹⁷⁾。



この非常に高い加水分解の ΔF° はピルビン酸のエノール型からケト型への転移に伴う結合エネルギー低下が多に影響していると思われる。

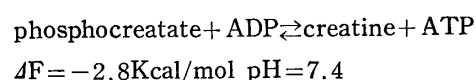


ケト型はエノール型に比し、結合エネルギーに関し、-18 Kcal/molも安定であり¹⁸⁾、また、ケト型はエノール型に比し、共鳴エネルギーに関しては、+10 Kcal/molで不安定である¹³⁾とする報告もある。したがって、 $-18 + 10 = -8 \text{ Kcal/mol}$ が互変異性に伴うエネルギー変化ということになる。

次に、炭水化物の酸化によって生じたATPが可逆性の高エネルギー化合物としての貯蔵物であるphosphagenについて述べる。

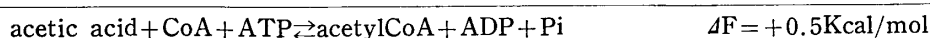
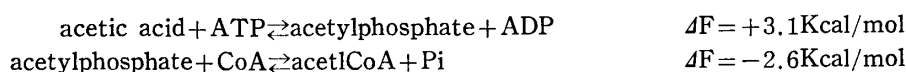
これらの化合物には、ホスホクレアチン、アルギニンリン酸などがある。

ホスホクレアチンを単離し¹⁹⁾、反応の ΔF を測定²⁰⁾したら

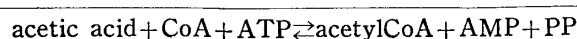
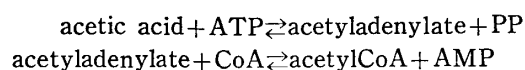


となり、より高いpHではOないし、やや正になり、また Mg^{2+} の濃度で変動し、ホスホクレアチンの加水分解の ΔF° は約-10.5 Kcal/molと報告されている。

式3



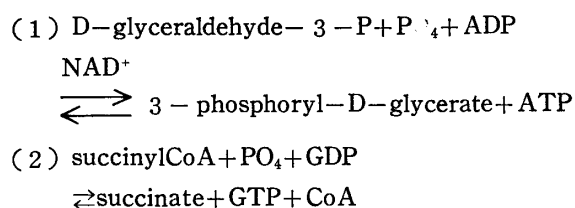
式4



phosphagen が高いエネルギーであると考えられる基礎には opposing resonance 効果など各種の因子が考えられるが、これらの物質の加水分解には、多くの有機リン酸化合物が P-O 結合を開裂するのに対して、P-N 結合の開裂がみられることが注目される。

リン酸化を基質レベルでみると、複合酵素系によって基質を分解するさいに生ずるエネルギーを貯えるには、エネルギー生産をリン酸のエステル化と共役させる方法が一般に考えられている。リン酸のエステル化は通常、機構のちがいから基質レベルのものと、電子伝達レベルのものと考えられている。

基質レベルのリン酸化は、化学基の転移に基づくもので、次の 2 例が代表と考えられる。

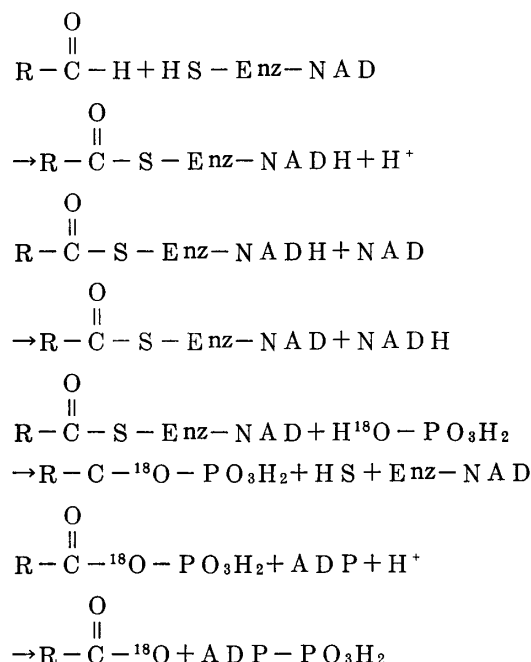


(1) の逆反応は光合成で、CO₂ の固定でできた最初の生産物である 3-ホスホ-D-グリセリン酸を ATP と NADH に変え、Calvincycle²¹⁾ にのせるさいに起る。

嫌気的な解糖ではこの順は逆になっている。この反応を触媒するのは、D-グリセリンアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素で、中間体として、1,3-ジホスホグリセリン酸を生じ、そこからホスホグリセリルキナーゼに触媒される ADP へのリン酸基転移がグリセリル-3-リン酸からグリセリル-モノリン酸への脱リン酸と共役して起る。

D-グリセリンアルデヒド-3-リン酸の酸化と ATP 形成の共役は、最初に Warburg によって見出されて以来、この共役は、酸化リン酸化の共役機構ときわめて類似であることが考えられる²²⁾。また ¹⁸O を使用して、C-O 結合形成による D-グリセリンアルデヒド-3-リン酸へのリン酸の結合がおり、ついで P-O 結合が切れてリン酸基がはずれることが明らかにされている²³⁾。したがってリン酸の ¹⁸O は残って、-CHO が -COOH に酸化されるさいに追加される O となる。同時に、低いリン酸転移ポテンシャルのリン酸基が高い転移ポテンシャルをもつ ATP の末端リン酸基となる。同時に起る脱水素は D-グリセリンアルデヒド-3-リン酸から電子と ADP およびリン酸からの H⁺ をうけて NAD⁺ の還元をひき起す。これらを触媒する D-グリセリンアルデヒド-

3-リン酸脱水素酵素は SH 基と、2 分子の結合した NAD をもっていて、ホスホグリセリル基と複合体を形成すると考えられている。したがって全反応は次のごとくである。



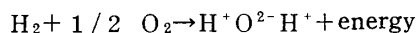
次にエネルギーが酸化還元によってどのように転換するかを考えると、細胞内のエネルギー転移の重要な機構は、ある分子から他の分子への電子移動に伴ってエネルギー転換が起ることである。電子伝達に伴う生物学的エネルギーの貯蔵ないし放出は、リン酸基ないしアデニル基の転移に伴う生物学的エネルギーと類似に考えることができる²²⁾。すなわち、ある分子を電子伝達ポテンシャル上に位置づければ、より負のポテンシャルをもつ化合物から、より正のポテンシャルをもつ化合物への電子の伝達はエネルギーの放出を伴う。さらに、水がリン酸基の最終受容体であったように、分子状酸素が電子の最終受容体であり、電子伝達反応のゼロ点となる (Fig-1)。電子伝達ポテンシャルは通常ボルト単位で表わされ、酸化還元反応の ΔF° との関係は、関与する電子数を n 、ファラデー定数 (23.068 Kcal/V) を F および標準電極に対して測定した電圧を E_o とすると、

$$\Delta F^\circ = -nF (E_o \text{ receptor} - E_o \text{ doner})$$

となる。

化学的な酸化還元においては、関与する電子数は 2 個であり、そのエネルギー変化には分子の再配列が含まれ

る。その例として水素と酸素から水が形成される反応においては、2個の電子が水素から酸素に移され、2個のH-Oなる極性結合が形成される。

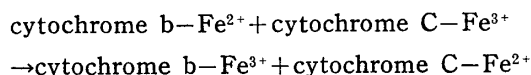


水素の酸化還元ポテンシャル (H_2/H^+) は-0.42Vであり、酸素の ($\text{H}_2\text{O}/\text{O}^{2-}$) は+0.816Vであるから、反応全体の ΔF° は、

$$\begin{aligned} \Delta F^\circ &= -2(23.068 \text{Kcal/V}) 1.236 \text{V} \\ &= -57.024 \text{Kcal/mol} \end{aligned}$$

となる。

また、単一電子の原子と分子間の転移によって、分子の再配列や化学反応を起すことなく、エネルギーを転移することが可能である。たとえば、鉄イオンは単一電子の付加によって Fe^{3+} から Fe^{2+} に変わる。このさいのエネルギー変化は化学的な酸化還元 ΔF° と同様に考えられる。たとえば、チトクロムb ($E_0 = -0.04\text{V}$)のチトクロムC ($E_0 = 0.25\text{V}$)による酸化は1電子転移であり、



となり、そのさいのエネルギー変化は、

$$\Delta F^\circ = -1(23.068 \text{Kcal/V}) 0.29\text{V} = 6.690 \text{Kcal/mol}$$

となる。

ある種の有機高分子は、異った分子と空間的に近い距離を保った複合体を形成することができ、高エネルギー軌道にある単一電子を他分子の低エネルギー軌道に移行することが可能であると考える。

以上はリン酸化合物、エネルギーおよび酸化還元について述べたが、酸化還元の実際の ΔF は ΔF° と異なり、化学反応の平衡と同じく電子供与体と受容体の初めの濃度に依存することはいうまでもない。しかし、特に酸化還元反応は、生体細胞中で高度に構造化した環境の中でおこなわれるので、試験管内の生化学反応の測定に基づいた自由エネルギーおよびエントロピーという古典的な熱力学による解決法では困難な現象が起り得る。たとえ

ば、細胞は一定の定常状態にあって、物質とエネルギーの出し入れは制御されている。このような定常状態の熱力学は閉鎖系における古典的な熱力学とは異ってまだ発展の初段階にあると思う。しかし、細胞内の反応物質の量、反応生成物の分解、特定の酵素などは全て精密な制御下にある。しかもそれらの因子は全て実際の ΔF に大きな変化を与えるものである。生活している細胞が、常に反応生成物を CO_2 と水に分解し続けるという事実は、多くの反応過程での平衡は永久に達することがないことと、このような条件下では試験管内では起ることが不可能に近い反応が、容易に定常な速度で進行することができることを示している。また、多くの細胞内反応は膜ないしその他の構造物に結合して起ることも古典的な熱力学による解釈を困難にしている。これらの反応過程は、溶液内反応というよりは半導体ないし固体の物理学で理解した方が解釈しやすいように思われる。特に水が反応物質ないし反応生成物である反応(加水分解や結水縮合反応)では、特にこの点の考慮が必要と考える。

このような反応が水溶液で起る場合は、反応の ΔF は系中の水の高い濃度によって規定されているが、同一反応が水の量が制限されている状態で起る場合は、自然に逆方向の反応が起る。これらの考慮は生活していて多くの機能している生体膜では局所的な非極性部分(脂質)が存在し、ある種の基本的に重要な生物現象が実際には水溶性というよりは脂質中で起こっていることから必要となってくる。

さらに考えると、生体系の多くの種類の分子が極く少量しか存在せず、それらのきわめて小さな単位に画分されていることである。酸化的リン酸化の機構の解明が困難な原因もこのことにあると思われる。他方、エントロピー、自由エネルギーや反応熱などは、全て統計的な概念であるので、単一分子におけるその意味付けは常に不分明である。この点を指摘して細胞構造内でのエネルギー転移ないし変換の分子内機構を明らかにすべく Sub-molecular-Biology²⁴⁾が提唱されているが、今後の研究は、submolecular レベルでのエネルギー転換の基本的な原理を解明し、考えを新たにした研究のありかたでなければならぬと思う。

文 献

- 1) Funaki, Y.: The Faculty Journal of Komazawa Women's Junior College., 8, 9 (1974).
- 2) Funaki, Y.: The Faculty Journal of Komazawa Women's Junior College., 9, 3 (1975).

- 3) Lohmann, K. : *Naturwissenschaften*, 17, 624(1929). eds., Academic Press, New York, 1960, vol. I, p. 107.
- 4) Meyerhof, O & Lohmann, K. : *Biochem. Z.*, 196, 22, 49(1928).
- 5) Meyerhof, O & Lohmann, K. : *Biochem. Z.*, 253, 431(1932).
- 6) Liebig, J. : "The Natural Laws of Husbandry", Walton and Maberly, London, 1863.
- 7) Harden, A & Young, W. : *Proc. Roy. Soc.*, B 78, 369(1906).
- 8) Lipmann, F. : *Advan Enzymol.*, 1, 99(1941).
- 9) Kalcker, H. : *Chem. Revs.*, 28, 71(1941).
- 10) Oesper, P. : *Arch. Biochem.*, 27, 255(1950).
- 11) Hill, T.L. & Morales, M.F. : *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 1656(1951).
- 12) Atkinson, M.R. & Morton, R.K. : "Comparative Biochemistry", M. Florkin and H.S. Mason. eds., Academic Press, New York, 1960, vol. II, p. 1.
- 13) Pullman, B. & Pullman, A. : *Radiation Res.* (Suppl.), 2, 160(1960).
- 14) Huennekens, F.M. & Whiteley, H.R. : "Comparative Biochemistry", M. Florkin and H.S. Mason, eds., Academic Press, New York, 1960, vol. I, p. 107.
- 15) Atkinson, M.R., Johnson, E. & Morton, R.K. : *Nature*, 184, 1925(1959).
- 16) DuPraw, E. J. : "Cell and Molecular Biology", Academic Press, New York, 1968.
- 17) Lohmann, K. & Meyerhof, O. : *Biochem. Z.*, 273, 60(1934).
- 18) Oesper, P. : *Arch. Biochem.*, 27, 255(1950).
- 19) Fiske, C.H. & Subbarow, Y. : *Science*, 65, 401(1927).
- 20) Noda, L., Kuby, S. & Lardy, H. : *J. Biol. Chem.*, 210, 83(1954).
- 21) Calvin, M. & Bassham J.A. : "The Photosynthesis of Carbon Compounds" Benjamin, New York, 1962.
- 22) Racker, E. : "Mechanism in Bioenergetics", Academic Press, New York, 1965.
- 23) Cohn, M. : *J. Biol. Chem.*, 201, 735(1953).
- 24) Szent-Györgyi, A. : "Introduction to a Submolecular Biology". Academic Press, Inc., New York, 1960.