

Title	Chara corallinaにおける起電性H+ポンプの電気生理学的解析
Author(s)	竹内, 裕子
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/1005">http://hdl.handle.net/11094/1005</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・（本籍）	竹 内 裕 子
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 6 3 7 3 号
学位授与の日付	昭 和 59 年 3 月 24 日
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	<b><i>Chara corallina</i>における起電性 <math>H^+</math> ポンプの電気生理学的解析</b>
論文審査委員	(主査) 教 授 岸本卯一郎 (副査) 教 授 原 富之 助教授 向畑 恭男 助教授 山本 泰望

### 論 文 内 容 の 要 旨

$H^+$ -ATPaseは、ミトコンドリア、葉緑体、バクテリア及び真核細胞の細胞膜に存在し、その構造解析は遺伝子レベルにまで進みつつある。生化学的解析のほかに、いくつかの輸送系が同時に存在する生理的条件下でのポンプ機構の解析は非常に重要である。

本研究は、植物細胞原形質膜に存在し、電位依存性を有する起電性  $H^+$  ポンプの  $i_p - V$  曲線を電気生物学的に解析し、反応速度論モデルで説明したものである。

材料は、車軸藻の一種、*Chara corallina* の節間細胞を用いた。起電性  $H^+$  ポンプの  $i_p - V$  曲線は、ポンプ阻害前の  $i - V$  曲線と、ポンプ阻害後、受動成分のみが残っていると考えられる  $i_d - V$  曲線との差より求められた。種々の薬剤を調べた結果、興奮性チャンネルにはほとんど影響を与えないでポンプのみを強く阻害するほぼ理想的なポンプ阻害剤として、triphenyltin chloride (TPC), 及び dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) が選ばれた。ポンプの  $i_p - V$  曲線はシグモイド型になった。 $i_p = 0$  になる電位すなわちポンプ起電力 ( $E_p$ ) は  $pH_o = 7.0$  の時、約  $-250 mV$  であり、外液の  $pH_o$  変化に対して  $-50 mV/pH$  で変化した。この結果は、*Chara* の  $H^+$  ポンプが ATP 1 分子加水分解と共に  $2 H^+$  を輸送する系であることを示している。

ポンプ阻害過程における最大の変化は、ポンプコンダクタンス ( $g_p$ ) の減少である。 $i_p - V$  曲線の傾きは、徐々に小さくなり最終的には 0 になる。 $E_p$  は  $-250 mV$  から  $-200 mV$  にまで脱分極した。

実験的に得られた  $i_p - V$  曲線は反応速度論モデルで解析された。このモデルは主に次の反応より成立し、②の反応のみが電位依存性を有しているものとした。

① ATP 1 分子加水分解に伴い内側の  $m$  個の  $H^+$  を吸着する。

②膜の内側から外側への $H^+$ の移動

③ $m$ 個の $H^+$ を膜外に放出し、もとの状態にもどる。

実際の $i_p - V$ 曲線は、 $m = 2$ としてこのモデルでシミュレートでき、阻害に伴う各反応速度変化について、いくつかの知見を得ることができた。 $g_p$ の減少は、主に膜外への $H^+$ 放出がおさえられることに起因している。これは、阻害剤が直接、植物原形質膜の $H^+$ ポンプに作用することを示唆している。また実験的に得られた阻害時の細胞内ATP濃度減少は、 $E_p$ の脱分極に対応していた。

一方、暗条件の場合にしばしば $E_p$ の大きな過分極 ( $-300\text{ mV}$ 以上) が認められた。この結果は、 $m = 2$ の $H^+$ ポンプ以外の系、すなわち $E_p$ が非常に過分極側にあるような $m = 1$ の $H^+$ ポンプが暗条件下で働くことを示唆するものである。

### 論文の審査結果の要旨

最近、動物・植物の細胞膜において起電性のイオンポンプの存在が確かめられつつある。シャジクモのような淡水産の緑藻はイオン濃度の低い環境に生育しており、細胞内に充分のイオン濃度を保持し、また生存に必要な分子をとり込むために起電性イオンポンプが積極的な役割を果していることが認識されるようになって来た。

この論文はシャジクモの細胞膜の起電性イオンポンプの電流・電圧特性を実験的に定量解析できる方法を開発し、そのような特性を示しうる速度論的モデルを提案している。

この起電性イオンポンプ機構は起電力と電圧依存性のコンダクタンスで表現できることが明らかにされた。このポンプ機構の阻害の前後の電流・電圧曲線の引き算によってポンプ機構の電流・電圧曲線を求め、これが大きな脱分極と過分極によって飽和するシグモイド型であること、ポンプのコンダクタンスが一定の電圧でピークを示すことを明らかにした。

ついでこのようなシグモイド型の電流・電圧を示す速度論的モデルを考案し、実測の電流・電圧曲線のシミュレーションに成功した。この結果決められたいくつかのパラメーターの値から速度論的モデルの速度定数が求められた。即ちポンプ機構の阻害時には細胞膜における $H^+$ の移動と細胞外でのその遊離の過程の速度定数が著しく減少し、このためポンプコンダクタンスが0になることが明らかとなった。シャジクモの起電性ポンプはATPの一分子の加水分解のエネルギーと共役して2個の $H^+$ を放出する型であること、さらに外液のアルカリ化に伴う電流・電圧特性の変化も、この速度論モデルの期待通りであることが示された。

これらの結果は、起電性イオンポンプの分子機構を解明するに当たって重要な知見を与えており、十分に理学博士の学位論文に価するものと判断できる。