

Title	Electrophysiological studies on Chara membran by means of internal perfusion
Author(s)	Shimmen, Teruo
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31595">https://hdl.handle.net/11094/31595</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【7】

氏名・(本籍)	新 <sup>しん</sup> 免 <sup>めん</sup> 輝 <sup>てる</sup> 男 <sup>お</sup>
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3 8 5 8 号
学位授与の日付	昭和 52 年 3 月 25 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	細胞内灌流法による車軸藻類原形質膜の電気生理学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 神谷 宣郎 (副査) 教授 岸本卯一郎 教授 殿村 雄治 助教授 田沢 仁

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体膜の電気生理学的研究の重要な手段の1つは、膜に接する液のイオン組成と濃度の変化に対する膜の反応をみることである。原形質膜に関しては細胞外液を変えることが容易なため多くの仕事は外液の変化に対する反応を調べることによりなされてきた。しかしながら生体膜は単なる脂質の二分子層のみからできている両面对称の膜ではなく、その構造、機能に表裏の極性があることがわかっていいる現在、膜の外側のみでなくて内側の環境の制御を可能にすることは膜機能の解明にとって非常に重要である。

イカの巨大神経では主として興奮性の研究において細胞内灌流法を用い、細胞内部のイオン種と濃度を変えることが行なわれている。車軸藻類に於ては液胞灌流法の開発により細胞内環境の制御が可能となった。しかしながら車軸藻類には原形質膜のほかに液胞膜があり液胞灌流法により制御できるのは液胞膜の内面が接している細胞液である。原形質膜の内面が接している原形質の条件を制御するには液胞膜の除去が必要である。それは液胞灌流液中に  $\text{Ca}^{2+}$  と強く結合する EGTA を加えることにより可能となった。液胞膜除去細胞の原形質膜は興奮性をはじめとする正常な機能を保持している。本研究はこのような細胞の利点を利用して以下の新しい事実を明らかにした。

#### (1) 細胞内液および外液中の陽イオンによる興奮性の制御

- (i) 活動電位の持続時間は細胞内の  $\text{K}^+$  濃度に依存し、濃度が高いと短くなる。 $\text{Na}^+$  や  $\text{Li}^+$  ではその作用が  $\text{K}^+$  より弱い。
- (ii) 活動電位の持続時間は外液の陽イオンによっても制御できる。1 価陽イオンの濃度を上げると持続時間は長くなる。適当な濃度(3-10 mM)では膜電位は静止電位レベルと興奮時の脱分極電

位レベルのどちらにでも留まり、電流刺激により二つのレベルの間を往復する。

- (iii) 2価の陽イオンは1価の陽イオンの作用を抑制するように働き、膜電位は静止電位に留まる傾向が強くなる。外液に高濃度の $K^+$ を加えると膜は電気刺激なしに自然に脱分極し、高濃度の $Ca^{2+}$ を含む液に換えると再び分極する。

このような1価及び2価陽イオンの膜に対する作用は静止状態では膜の外側の負電荷を持った部位を2価陽イオンが、興奮状態では1価陽イオンが占めるというTasaki(1968)の仮説により説明される。

#### (2)細胞内ATP及び $Mg^{2+}$ による静止電位と興奮性の制御

(i)細胞内灌流用のEGTA液にhexokinase及びglucoseを加えて原形質中のATP濃度を下げると又はEGTAの代りにEDTAを用いて原形質中の $Mg^{2+}$ 濃度を下げると静止電位は約半分に減少し膜抵抗は著しく増大する。同時に興奮性も失われる。このような細胞を再び $Mg^{2+}$ とATPを含むEGTA液で灌流すると、電位、抵抗、興奮性共に回復する。

(ii)open-vacuole法を用い $Mg$ -ATPによる電位の回復過程をみると、それは大変速く、灌流が始まると同時に始まる。

(iii)同法を用い、外液に $Pb^{2+}$ を加え細胞の興奮性を抑制するとATPを含む液と含まない液で交互に灌流して電位を自由に制御出来る。 $Mg^{2+}$ についても同様な実験が可能である。

(iv) $Mg^{2+}$ とATPが共働性であること及びATPの類似体であるAMP-PNPが不活性であることから膜電位と興奮性の維持に $Mg^{2+}$ 依存性のATP分解酵素の関与が示唆される。

以上本研究に於て車軸藻類の膜には静止、興奮および“低ATP状態”があること、それらの状態間の転移は陽イオン及び $Mg$ -ATPにより制御されること、及び低ATP状態における膜電位の細胞外 $K^+$ に対する反応は静止状態のそれと同じであることがわかった。

### 論文の審査結果の要旨

新免君はシャジクモ(*Chara*)の節間細胞をEGTAを含む液で灌流することにより、細胞から液胞膜を除去することに成功した。この新しい方法によって植物細胞膜の特性をイカの巨大神経と同じレベルで研究しうるようになったことは特筆に値する。本論文は2部からなる。

1. 原形質膜の興奮性の制御。細胞内の $K^+$ 濃度を低くすると、正常細胞の場合より経過の長い活動電位が発生する。活動電位の持続時間は、細胞内の $K^+$ 濃度を一定にしても、外液中の1価カチオンと2価カチオンの比によって制御される。例えば一定の $Ca^{2+}$ 濃度下で $K^+$ 濃度を上げると持続時間は長くなり、適当な濃度では膜は外向電流により脱分極状態にとどまるようになる。このとき内向電流を与えると再び静止電位にもどり、その状態にとどまる。この事実は原形質膜に二つの安定状態があることを示唆し、活動電位は静止状態から脱分極状態への一過的移行であると理解される。原形質膜に二つの安定状態があることはイカの巨大神経でTasaki等により提唱されていることであるが、植物細胞の興奮現象も動物細胞と同じ機作によって支配されていることが示された。

2. 細胞内ATPおよび $Mg^{2+}$ による静止電位と興奮性の制御。シャジクモの膜興奮は内部のATPおよび $Mg^{2+}$ 濃度によって制御される。このことは植物細胞では膜ATPaseがはたらくことにより興奮性が保たれることを示している。植物細胞の膜電位はイオン拡散電位の他に代謝によって支えられている部分があることが知られている。これは恐らくATPをエネルギー源とする起電性ポンプによるものであろうと云われてきた。新免君は灌流実験を巧みに駆使して、シャジクモ細胞の膜電位の相当部分がATPと $Mg^{2+}$ によって制御されていること、しかも膜電位の発生には $Mg^{2+}$ 依存性の膜ATPaseによるATP分解が必須であることを示唆した。

以上新免君の論文は、植物細胞の膜生理学で現在注目的になっている重要な問題点に対し、細胞灌流法によって確実な実験的証拠を与えたもので、理学博士の学位論文として十分な価値あるものと認める。