



Title	カラ節間細胞の起電性イオンポンプの機構
Author(s)	上池, 伸徳
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/968
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

甲 - 2846

博士學位論文

カラ節間細胞の
起電性イオンポンプの機構

物理系生物工学専攻

上池 伸徳

博士學位論文

カラ節間細胞の
起電性イオンポンプの機構

物理系生物工学専攻

上池 伸徳

要 旨

カラ (Chara) 節間細胞の膜電位は、一般に拡散電位で予想されるよりも過分極している。その原因である起電性イオンポンプの解析には、このポンプが電気生理学的にどのように記述されるかが問題となる。そのためには、いろいろの条件で膜電位 E_m と膜コンダクタンス G_m の両方の正確な値を知る必要がある。そこで E_m と G_m を正しく評価できる測定系を開発した。

起電性イオンポンプを阻害するために暗条件下でミトコンドリアやクロロプラストのエネルギー転換阻害剤塩化トリフェニルスズ (TPC) を添加すると、 E_m が -200 mV から -100 mV に脱分極し、 G_m が $150\mu\text{S}/\text{cm}^2$ から $60\mu\text{S}/\text{cm}^2$ と減少した。又、この時細胞内 ATP 濃度が $1/3$ となった。これは ATP のエネルギーを使って電位差を発生させる起電性イオンポンプの存在を示している。ポンプは、受動成分の起電力 E_1 、コン

ダクタンス g_1 と同様に、起電力 E_2 とコンダクタンス g_2 が直列につながったものとして表現できる。通常の条件では $g_2 = 90 \mu S/cm^2$, $E_2 = -267 mV$ である。ポンプ電流は静止時で受動チャンネルに内向き電流、約 $-6 \mu A/cm^2$ を送っていることになる。TPC は興奮性を失なわせる 2,4-ジニトロフェノール (2,4 DNP) にくらべて、受動成分に殆んど影響を与えない。TPC は起電性イオンポンプの理想に近い阻害剤であると考えられる。ポンプを阻害すると活動電位の持続時間が長くなる。通常の状態では活動電位発生中にはポンプ電流が約 3 倍となるが、TPC はポンプ電流をなくするので、ポンプ電流が活動電位のもどりに寄与しているかもしれない。

温度を変えた実験によれば g_2 の Q_{10} は約 2 で、その活性化エネルギーは $20^\circ C$ 付近で変っている。ポンプは酵素反応と共役しているが、二つ以上の反応系を含んでいると考えられる。

E_2 の pH による変化は $-49 mV/pH$ で、 g_2 は pH が

大きくなると減少した。これは起電性ポンプが主として H^+ ポンプであることを表わしている。そこで、 H^+ ポンプがATP分解を伴う起電性イオンポンプとしてそなえるべきいくつかの過程を組合せたサイクリックな化学反応を考えた。それは、ポンプ構成分子の、1) ATP加水分解、2) 内側での H^+ の結合、3) 膜の外側への移動、4) 外側での H^+ の解離、5) 膜の内側への移動、の五つである。この内、正味の電荷を運ぶ3)の反応だけが電場依存である。このような反応系から、 H^+ のフラックスを計算してポンプの電流電圧特性を求めると、ポンプが内部抵抗を持った起電力として表わされた。 E_2 の値から、ポンプは1モルのATP加水分解によって2モルの H^+ を細胞外に排出すると考えられる。又、上の反応系によって E_2 と g_2 のpH依存性が再現できる。TPCによる阻害の過程で E_2 は一時的に分極するが、これは1モルのATP分解によって排出される H^+ のモル数が減少する可能性を示唆している。この時、

TPC は ATP 濃度を介してだけでなく直接 H^+ 排出機構を阻害していると考えられる。また受動成分の E_1 のわずかな pH 依存性は H^+ 2 分子と Cl^- 1 分子の共輸送の寄与があることを示唆する。

以上のように、 G_m と E_m を正確に測定することによって起電性ポンプの速度論的解析が定量的におこなえるようになり、受動チャンネルとの関連も明らかとなった。これは今後、生化学的研究がなされている能動輸送 ATPase のようなイオンポンプの速度論的あるいは、分子論的研究を助ける重要な知見を与えると思われる。

本論文の内容は、
次の論文に掲載されています。

1. Kishimoto, U., N. Kami-ike, and Y. Takeuchi (1980)

The role of electrogenic pump in Chara corallina
J. Membrane Biol. 55 149-156

2. Kishimoto, U., N. Kami-ike, and Y. Takeuchi (1981)

A quantitative expression of the electrogenic pump and
its possible role in the excitation of Chara internodes
In: The biophysical approach to excitable systems
edited by W. J. Adelman, Jr. and D. E. Goldman
165-181 (Plenum Publishing Corporation, 1981)

目 次

1 章 緒 言

1-1. 起電性イオンポンプ研究の歴史

1-2. 起電性イオンポンプ研究の方向

2 章 膜コンダクタンス測定法

2-1. 膜コンダクタンスの正しい評価

2-2. 材料、液組成

2-3. 実験セルと電流固定回路

2-4. テストパルス重畳法

2-5. データ取り込み回路

2-6. データ解析

2-7. 膜コンダクタンス

3章 起電性イオンポンプ

3-1. ポンプと阻害剤

3-2. 受動成分と起電性成分

3-3. 起電性イオンポンプと活動電位

4章 阻害剤と細胞内 ATP 濃度

4-1. 細胞内 ATP 濃度

4-2. 細胞内 ATP 濃度測定法

4-3. 阻害剤の効果

5章 温度特性

5-1. 静止電位と活動電位

5-2. 活動電位の持続時間

5-3. 温度と受動成分、起電性成分

5-4. 膜コンダクタンスと

活性化エネルギー

6章 起電性イオンポンプの機構

6-1 pH特性

6-2 ポンプの機構とモデル

6-3 結び

1. 緒言

植物細胞の膜電位は、膜を透過するいろいろなイオン種の平衡電位よりも過分極している例が多い。一方、エネルギー代謝を阻害する薬物を与えたり、低温にすると膜は急速に脱分極する。Goldman の式に代表されるような受動的拡散の理論による解析でこの現象を説明するのは不可能である。一方、赤血球膜や筋小胞体膜、電気ウナギの発電器官の非神経支配側の膜などでは ATP 加水分解によって生ずる自由エネルギー変化を使って Na^+ , K^+ , Ca^{++} 等のカチオンを能動輸送する ATPase の存在が生化学的に明らかとなっている。このような ATPase ではどのような反応系によって輸送がおこなわれるか、そしてどのような化学量論でもって輸送されるかがくわしく研究されてきている。その成果として能動輸送で、ATP、1モルの加水分解でどのイオン種が何モル輸送されるかがわかっている。たとえば

動物細胞の細胞膜に普遍的に存在するとされている Na^+ , K^+ -ATPase は、 Na^+ を 3 分子排出し K^+ を 2 分子取り込む。筋小胞体膜の Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase は、 Ca^{++} を 2 分子取り込み、 Mg^{++} を 1 分子排出する。ここで注目すべきことは能動輸送されるイオンの電荷の帳尻りが内外でそれぞれゼロになっていない場合が多い。 Na^+ , K^+ -ATPase では、正電荷 1 個が正味に外に排出されることになる。膜の内外では、それぞれ電気的中性条件が満たされる必要があるので、膜の他の部位を何かイオンが流れて帳尻りを合せることになる。従ってこの能動輸送の機構もなんらかの形で膜電位の一部を構成している。つまり、能動輸送の機構（イオンポンプ）は、起電性を持つことになる。この起電性イオンポンプは、エネルギー源として細胞内 ATP を消費しているので、エネルギー代謝と直接関係がある。植物細胞の『膜電位の不思議』は、細胞膜に起電性イオンポンプが存在している為と考えると理解できる。

この研究では、エネルギー代謝阻害剤、低温、pH変化等の方法で、車軸藻節間細胞の細胞膜の起電性イオンポンプについて調べた。ポンプについての研究課題としては、(1)起電性イオンポンプが電気生理学的にどのように記述されるか、(2)イオンポンプが起電的に輸送しているイオン種は何か、(3)エネルギー源は何か、(4)ポンプの分子機構はどのようなになっているか、(5)受動チャネルとの関連でどのような生理的意義を持っているか、の五点がある。

1 - 1 起電性イオンポンプの歴史

60年代になるまでは、イオンポンプは、単純に受動チャンネルが拡散電位によって膜電位を発生するためのイオンの濃度勾配を維持している機構であると考えられていた。このような系では、膜電位は、最も正側の平衡電位と最も負側の平衡電位の間にある。イカの巨大神経では静止膜電位は、 K^+ の平衡電位 E_K に非常に近く、 K^+ 濃度を変えた時の感受性が大きいことから、 E_K によってほとんど決まっているとされていた。

起電性イオンポンプ研究の歴史は、1960年代に始まっている。最初に Kernen(1962)によって起電性ポンプの存在が示された。彼は、カエルの骨格筋を低温下で K^+ -free 溶液で洗うことによって Na^+ を細胞内にロードして、次に室温中で正常濃度の K^+ を含む液に細胞を移すと K^+ の平衡電位よりも 11 mV 過分極した膜電位となった。次に、Kerkut ら(1965)は、カタツ

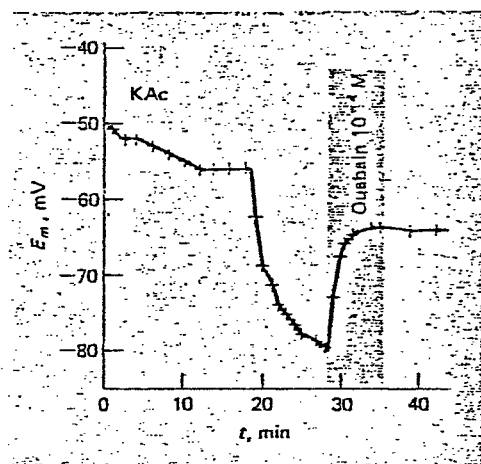


図 1-1 K^+ , Na^+ を細胞内に注入した時の
カタツムリの神経細胞の膜電位変化。
0分で K^+ , 約20分で Na^+ を注入。
[Kerkut (1965)]

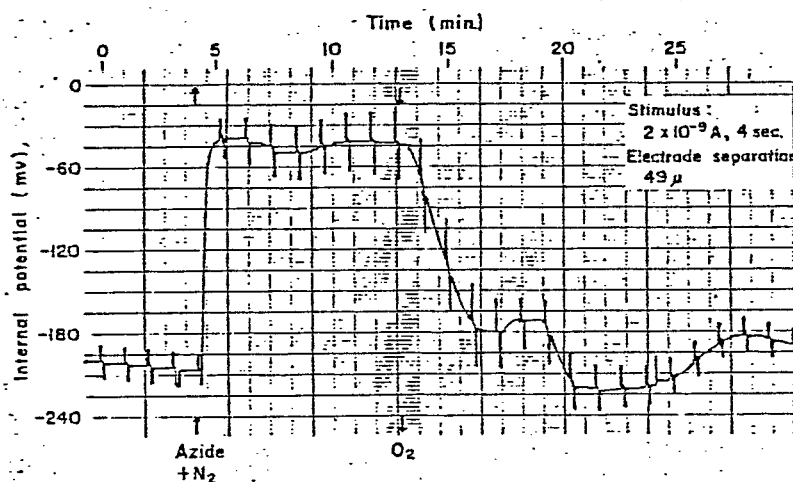


図 1-2 アカパンカビに NaN_3 をあたえた
時の膜電位と膜抵抗の変化。
[Slayman (1965)]

ムリの神経細胞に K^+ を注入してもあまり電位の変化がないのに、 Na^+ を注入すると急速な過分極がおこることを示した。この過分極は、 Na^+ 、 K^+ -ATPaseの特異的阻害剤ウワバイシンの添加によって急速に失われる。(図1-1)

動物細胞に続いて植物細胞でも、Slayman (1965) がアカパンカビの糸状体細胞の膜電位が拡散電位として期待される電位よりも過分極している (-200 mV 以上) が、エネルギー代謝を阻害すると -10 mV 近くまで、可逆的に脱分極することを示した (図1-2)。同時に膜抵抗も最初の1分間で約30%増大した。アカパンカビの E_K は -188 mV である。

この論文で用いた車軸藻 (カラ・ニテラ) では、静止膜電位が E_K よりも過分極側にあることが多い。一般に膜電位は、 $-180\text{ mV} \sim -220\text{ mV}$ なのに E_K は -180 mV 程度しかない。Kishimoto (1959) は、膜電位が人工池水 (APW) 中の K^+ や Na^+ の濃度を変えても低濃度域ではあまり感じないのに pH を変えると大きく変わること示し

た。その後 Kitasato (1968) は、ニテラの膜電位が pH_{out} が 3~7 で大きな pH 依存性を示すこと、 E_K に電圧固定して外液の pH を変えた時にクランプ電流が著しく変化することから、膜は受動的に H^+ を通しやすいと考え、膜電位の式 (Goldman の式) に P_H の項を入れる必要があると考えた。しかし、実際の電位は、イオンフラックスから予想される値よりも数 10 mV 深いことから、外向きの H^+ の起電性ポンプが存在すると考えた。彼は、電位の pH 依存性よりポンプが受動チャンネルにポンプ電流を流しこむ定電流源であると考えた。(この学位論文で、電流源の性質を論ずる時は、受動チャンネルに対してどのような電流を流すかを問題としている。) Saito と Senda (1973) は、膜電位と膜抵抗の pH 依存性を調べた。 pH_{out} を 5.5 → 8.2 にすると抵抗が $\frac{1}{2}$ になった。又、脱共役剤 DNP の添加、あるいは低温の条件にすると、電位の pH 依存性がなくなること示した。最近、Keifer and Spanswick (1978) は、ATPase 阻害剤や

脱共役剤によって膜電位が脱分極するとともに膜抵抗が増大することを示した。又、Keifer and Spanswick (1979) は、暗 + $5\mu\text{M}$ CCCP 条件で細胞内 ATP 濃度が 10 分の 1 になることから、起電性ポンプのエネルギー源が ATP であるとした。Tazawa and Shimmen (1977)、田沢と新免 (1977, 1981) は、EGTA、ATP を含む液でカラ節間細胞内を灌流し、液胞膜 (トノプラスト) を除去した標品を作った。彼らは、この標品の内液を種々の組成を持った液と交換することによって膜内外のイオンなどの濃度を制御した。さらに ATP を積極的に消費させる目的で、ヘキソキナーゼ + グルコースで灌流すると膜電位が -200mV 前後から -100mV 近くに脱分極して、抵抗が 30% 増大した。この状態で ATP アナログ (AMP-PNP) を流しても元に戻らなかった。又、 Mg^{++} のキレート剤を流すと ATP 存在下でも回復しないことから起電性ポンプは、 Mg^{++} -ATP を基質としているとした。ATP-free にすると、膜電位・膜抵抗の pH 依存性がほとんどなくな

った。車軸藻では、起電性ポンプは、 H^+ ポンプで、 Mg^{++} -ATP をエネルギー源としていると想像される。

1-2 起電性イオンポンプ研究の方向

電気生理学の手法に関して次の点が重要である。後に詳しく述べることになるが、ここで問題とする種々の環境下で膜電位・膜抵抗の変化から、膜電位成立の原因を探る場合、膜電位の細胞表面での一様性と膜抵抗測定 of 正確さが正しく評価されている測定系を使用する必要がある。カウニテラでは、イカ巨大神経のように空間固定が可能である。故に、電流固定の条件が非常に満足しやすく、しかも信頼されうる。しかし、従来の多くの研究では材料の問題があるとはいえ、空間固定をしっかりとおさえている研究は非常に少ない。

その上に、通電中に起る膜起電力の変化の補正など抵抗測定の問題が上のせされている。この研究では、現在可能とおもわれる最も正確に近い膜抵抗測定系を用いて実験を行なった。

車軸藻節間細胞の原形質膜にある起電性イオンポンプは、 Mg^{++} -ATP をエネルギー源として H^+ を細胞外に排出している。ポンプは、受動チャンネルに対して電流源として働いて膜電位を過分極させる。問題はポンプが電気生理学的にどのように記述されるかである。

Kitasato (1968)、田沢・新免 (1981) は、ポンプが定電流源であると考えている。又、Slayman (1965) もアカパンカビのポンプ電流が NaN_3 による阻害によって減少してゆくにつれて膜電位が脱分極するので定電流源の立場では、受動成分のコンダクタンス減少が起っていると考えるを得なかった。ただし彼は、近年定電流源ではないと考えている。(Hansen ら, 1981)

植物細胞の原形質膜に動物細胞の膜にある能

動輸送の ATP-ase (Na^+ , K^+ -ATPase など) やミトコンドリアの F_1 , F_0 の ATP 合成系と類似機構のものが存在することは、まだ生化学的に実証されていないが、この論文では、化学反応として同様のものがあると想定する。

ATP・1モルの加水分解によつて生じる自由エネルギー変化で -200mV にもおよぶ静止電位を遡のぼつて数モルの H^+ を外に輸送すると、そのエネルギー収支はほとんどゼロに近い。言うことは、輸送の為の化学反応の速度が電場によつて変化する可能性を示している。言い換えると、ポンプがポンプ電流を流す能力は、電場の影響をうけて変化する应考虑すべきである。このことは、ポンプが定電流源と考えることに無理があることを示している。以上の理由から、起電性ポンプは、内部抵抗をもつた起電力として表現すべきであろう。ただ、この起電力と抵抗は、従来考えられてきた受動輸送の理論ではなくて、輸送 ATPase の化学反応系のパラメータとして考えなくて

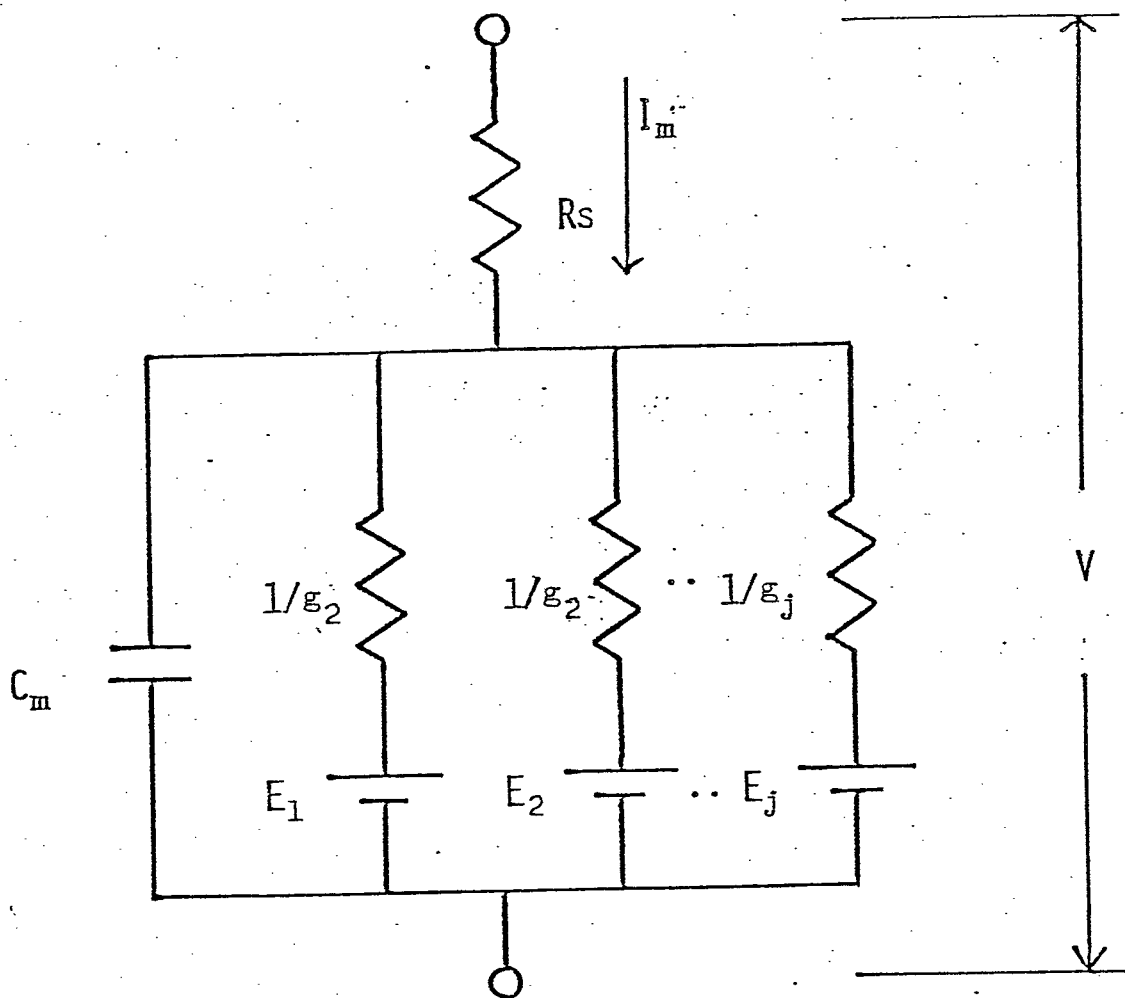
はいけない。

この論文では、まずより正確な膜パラメータの決定法について論じる。次に、起電性ポンプの成分を決めるための阻害剤の実験を示す。次に、エネルギー源としての細胞内ATP等のアデニンヌクレオチドの濃度変化のデータを示す。次に、酵素反応としてポンプをとらえた時に重要な温度特性とポンプ活性の関連について考察する。最後に、ポンプが H^+ ポンプであることを証明して、それまでに得られたデータを説明するために化学反応モデルを考えて、ポンプの分子機構の解析を試みる。

2 膜コンダクタンス測定法

2-1 膜コンダクタンスの正しい評価

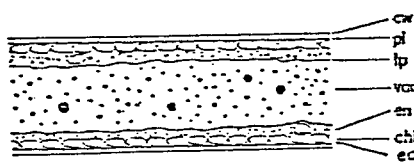
電気生理学の手法に、環境条件をかえて、膜電位が変化したということから、その原因がどこにあるかという議論の仕方がある。一般に、膜の等価回路は Hodgkin and Huxley の神経モデル(H-Hモデル)でも示されているように、種々の成分(一つの成分は、抵抗と起電力が直列に並んだもの)が並列にならんでいるものとして表現できる(図2-1)。この回路の起電力 E とコンダクタンス G は、図中の式の様に書ける。この式から、 E の変化だけから、どの成分のコンダクタンスが変化したのか、どの成分の起電力が変化したのか想像しにくい。そのような時、コンダクタンス G の変化も同時に測定しておくと、どの成分が影響を受けたのか非常に判り易くなる。そこで、テストパルスを電流に重畳させて、その



$$E = \sum_j \frac{g_j E_j}{G}$$

$$G = \sum_j g_j$$

図 2-1 膜の等価回路



av: 細胞壁, pl: 原形質膜, ph: 液性膜, vac: 液胞,
en: 内質, chl: 葉綠素, ec: 外質

図 2-2 カラ節間細胞の断面図
〔田沢・新免(1981)より〕

電圧応答からコンダクタンスを求める方法がある(テストパルス重畳法)。この方法は、たとえばペンレコーダのチャート上でレスポンスを見るときに、大ざっぱなことでもかなり色々なことが判る。しかしチャート(記録紙)上の線が太かったりして大きな変化でないと判らなかったり、変化を大きくするためにテストパルスを大きくすると膜起電力も大きく変化するので、十分注意する必要がある。又、電圧応答が十分に定常に達していなかった場合も不正確となる。ここでは、以上の様な危惧をなくするために、空間固定、電流固定条件下でテストパルス重畳法を用いた。起電力変化が無視できるような、小さい方形波のテストパルス電流を膜に流して、電圧応答を計算機に取り込み、カーブフィッティングして求めたパラメータから、その時の膜コンダクタンス、膜容量、シリーズ抵抗を決定する。これを連続的に行なうことにより、シャジク毛節間細胞の活動電位と、ともに、膜コンダクタンス

はどが、どの様に变化するかは正確に決められる。

2-2 材料・液組成

a) 材料

実験材料として車軸藻の一種、フシナシシャジクモ Chara corallina (本文中シャジクモ) の節間細胞を用いた。底によく洗った土を5cm程度敷いた50ℓのポリバケツにため水を張って、他のバケツからシャジクモを株分けし、20℃前後、12時間の明暗サイクルで照明する。標品として、上頂端から2~5番目の比較的若いきれいな、節間細胞を選ぶ。直径0.7~1mm、長さ5~10cm程度である。図2-2は、節間細胞の断面図である。この細胞は直径が大きく、長い円筒状をしている。原形質膜のすぐ内側にはクロロプラストが規則正しく並んでいる。又、細胞の容積のほとんどが液胞で、原形質との境に液胞膜(ト)プラスト)がある。原

形質膜には、伝導性の活動電位を発生する機構がある。

b) 液組成

実験に使用する基本的な人工池水 (APW) の組成は、

0.05 m M	KCl
0.2	NaCl
0.1	Ca (NO ₃) ₂
0.1	Mg (NO ₃) ₂

で、2mM の種々の Goods Buffer を pH に応じて、用いた。(主に、TES、MES、Tricine 使用した (注))
切り出した細胞は実験に供する前に少なくとも3日間、自然光下で APW 中に静置する。

注)

TES: N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethane sulfonic acid

MES: 2-N-morpholinethane sulfonic acid

TRICINE: tris hydroxymethyl-methylglycine

尚、原形質のイオン組成は、Tazawa ら (1974) の測定値から、 K^+ 112 mM, Na^+ 3 mM, Cl^- 21 mM を採用した。

2-3 実験セルと電流固定回路

実験セルは、アクリルブロックから縦型フライス盤で削り出した。(図2-3) 外部電流電極は銀/塩化銀の板状電極で、内部電流電極は、アルカリで電解研磨して細くしたタンクステン線を用いた。それぞれの電流電極は、電流固定を安定に行うために、Cole and Kishimoto (1962) に従い、白金黒でコートしてある。電流電極の長さや配置は、空間固定の条件を十分満していることをチェックした。なお測定領域は 7 mm とした。膜電位は、3M KCl を入れたガラス微小電極を領域の中央部に刺入して、外液との間の電位差として測定した。外液中におく参照電極は、微小電極と同様に、銀/

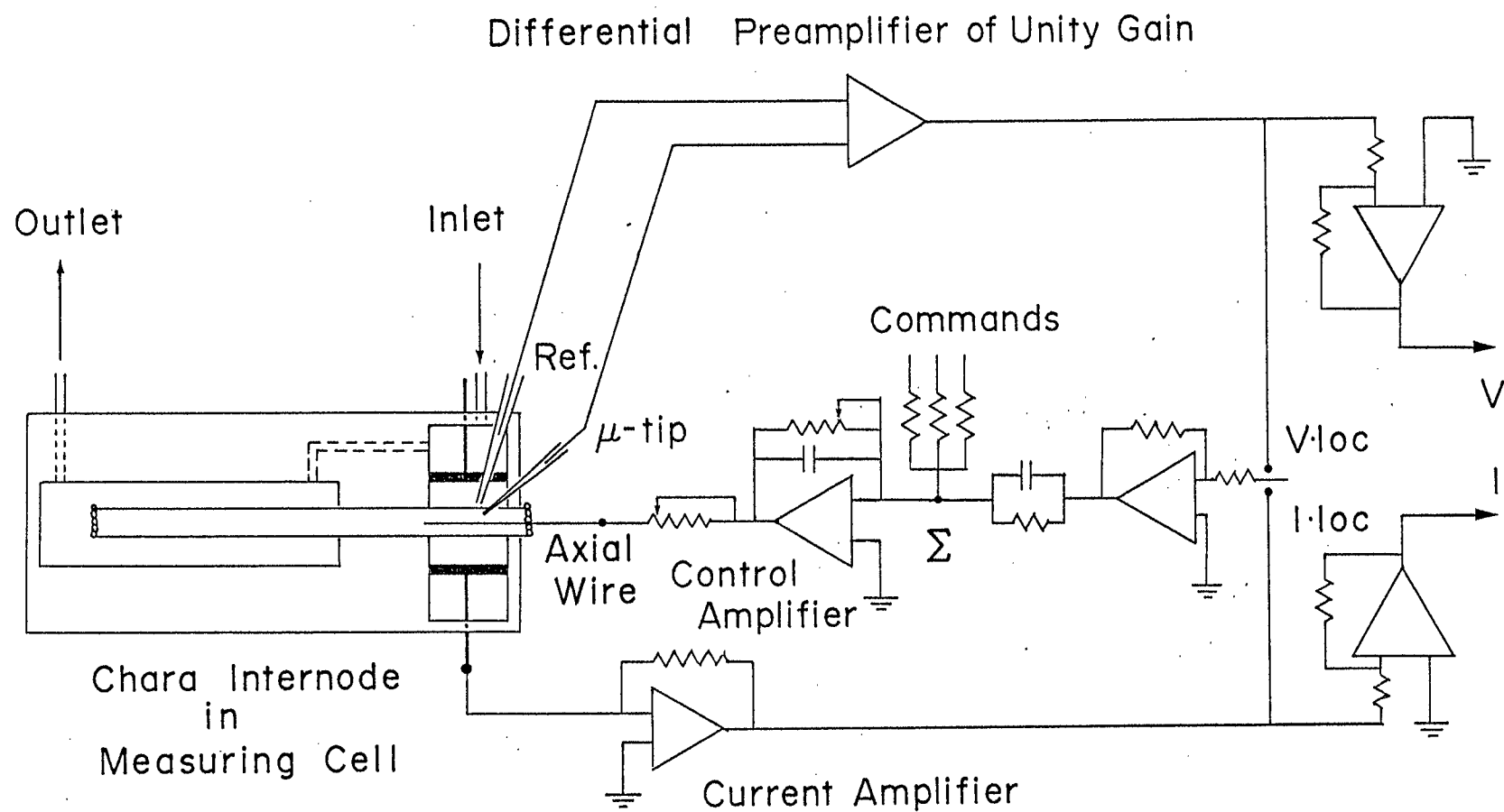


図 2-3 電流 - 電圧固定回路と実験セル

塩化銀電極を用い、150mM KClを含む寒天ブリッジで接続してある。

実験中は、サーモモジュール(クール=クス)で温度制御した外液(一般にAPW)を1l/hr. の速さで流している。温度はサーミスタ温度計、pHは、小型のガラス電極をそれぞれ外液中に入れることによってモニターした。

電流固定回路(図2-3)は、ゲイン2000倍の負帰還回路で、この研究では、特に、微小な電位変化を観察するために、ドリフトやノイズの特に少ないオペアンプを選んで構成した。

(オペアンプ: PMI社 OP-07, DATEL社 AM-303B 等) 電流固定の速さは十分に速い(50 μ sec)。活動電位を発生させるための刺激は、コマンド点から約20msecの短い脱分極パルスを与えることにより行なった。テストパルスも同様に、コマンド点から適当なゆと振幅で与えた。

2-4 テストパルス重畳法

電流固定条件下で、膜電流をゼロに固定し、その上に振巾の小さい方形波電流(テストパルス)を流して、膜電位応答を見る。応答を解析することによって、その時点の膜コンダクタンスがわかる。

膜は Thévenin の定理 (Cole (1968)) より

$$V = I \cdot Z + E$$

と表現できる(図2-4(a))。E, I, V, Z は、それぞれ膜起電力、膜電流、膜電位、膜インピーダンスを表す。小さい電流の揺動を与えた時の電圧応答は

$$v = i_o \cdot Z + I \cdot \Delta Z + \Delta E$$

となる。今、 $I=0$ に電流固定してあるので、第2項は無視できる。第3項は ΔE をできるだけ小さくすることによって、大きくならないようにするのが望ましい。膜の等価回路を、図2-4(b)の様に表現する。 r_s , r_m , C_m , E, I, v は、それぞれ、シリーズ抵抗、膜抵抗(膜

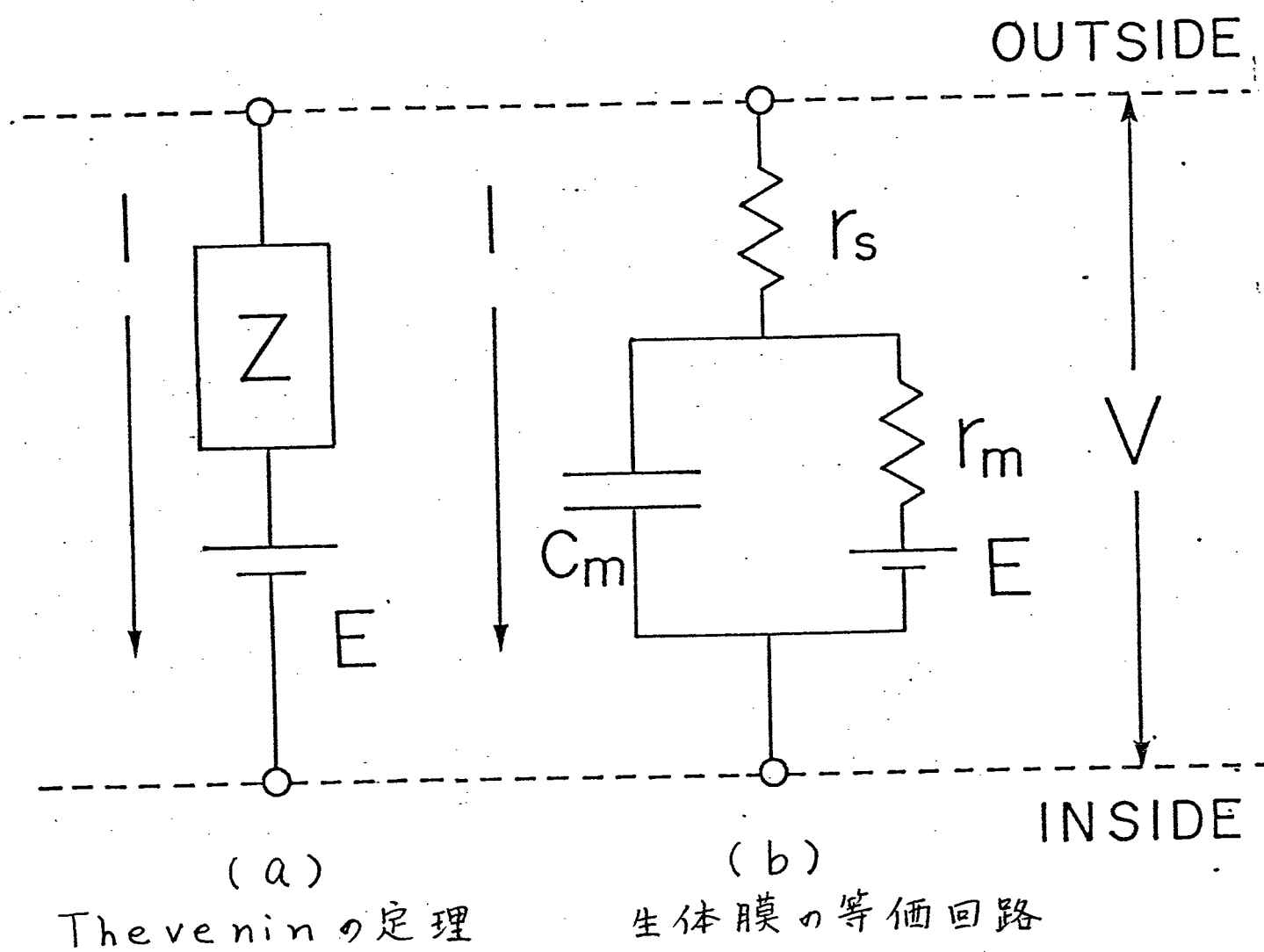


図 2-4 膜の等価回路

コンダクタンスの逆数)、膜容量、膜電流、膜電位である。シリーズ抵抗は、内外の溶液の抵抗や膜表面の非攪拌層の抵抗を含んでいる。この抵抗成分は、電圧応答を求める時に、必須の項として現れる。この回路に、方形波のテストパルス電流 i_0 を流した時の電圧応答、 $V(t)$ は、近似的に

$$V(t) = r_s \cdot i_0 + r_m \cdot i_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{C_m \cdot r_m}} \right)$$

となる。実際の電圧応答を上式にカーブフィッティングすると、膜のパラメータが全て決定する。ところが節間細胞には液胞膜があり、ガラス微小電極は一般に液胞内に刺入されている。液胞膜は、膜電位、抵抗も小さいが、その寄与分の補正が必要となる。又、起電力変化分 ΔE が入る可能性もある。故に、上式にもう一項の指数関数を導入する方が、よりよいフィッティングとなる。 ΔE の項は、過分極方向のテストパルスを用いることで小さくできる。

2-5 データ取込み回路

テストパルス重畳法は、その時点での膜の電気的性質が決められるという利点がある。

Ohkawa and Kishimoto(1975)によつて、車軸藻の興奮性についての研究ではかなり有用に使われている。又、彼らは内部灌流してプラト一型の活動電位を発生するイカ巨大神経にも適用して、よい結果を得ている。

従来の方法では、オッシロスコープを写真に写したり、レコーダの記録紙から電圧応答を読みとるため、S/N比やダイナミックレンジが大きくとれなかった。大きな応答を得るためには、必然的にテストパルスを大きくせざるをえなかった。又、電圧応答を膜等価回路にフィットさせる試みも少ない。(大川、岸本(1973), Binstock, Adelmanら(1975); 前者は車軸藻、後者はイカ等の巨大神経)さらに、従来は、この応答のフィッティングに時間がかかりすぎた。

この研究では、高速かつ正確に膜コンダク

タンスを連続的に決めるために、多チャンネルアナログ入力、高分解能 A/D 変換器を持ったマイクロコンピュータ（マイコン）システムで、データ取込み、解析の一環システムを作った。システムはデータ取込みを主に行うサブシステム、解析を主に行うメインシステムの2つのマイコンから構成されている。このシステムは取込みと解析を同時に実行できる(図2-5)。サブシステムは、CPUをZ-80Aに置き換えたTK-80BS(NEC)で構成されていて、以下の様な特徴を持つ。

i) アナログ量をデジタル量に変換する A/D 変換器に 12 ビット (4096 分の 1) の分解能と 8 チャンネルの入力端子を持つデータアキュイジションシステム(DATEL社, MDAS-8D)を使った。

ii) ソフトウェア開発と制御を行うために、アセンブラと会話型言語 BASIC を搭載している。

iii) データは、デジタル量として、デジタルカセット(TEAC社 MT-2)2台に、蓄えられ、マイ

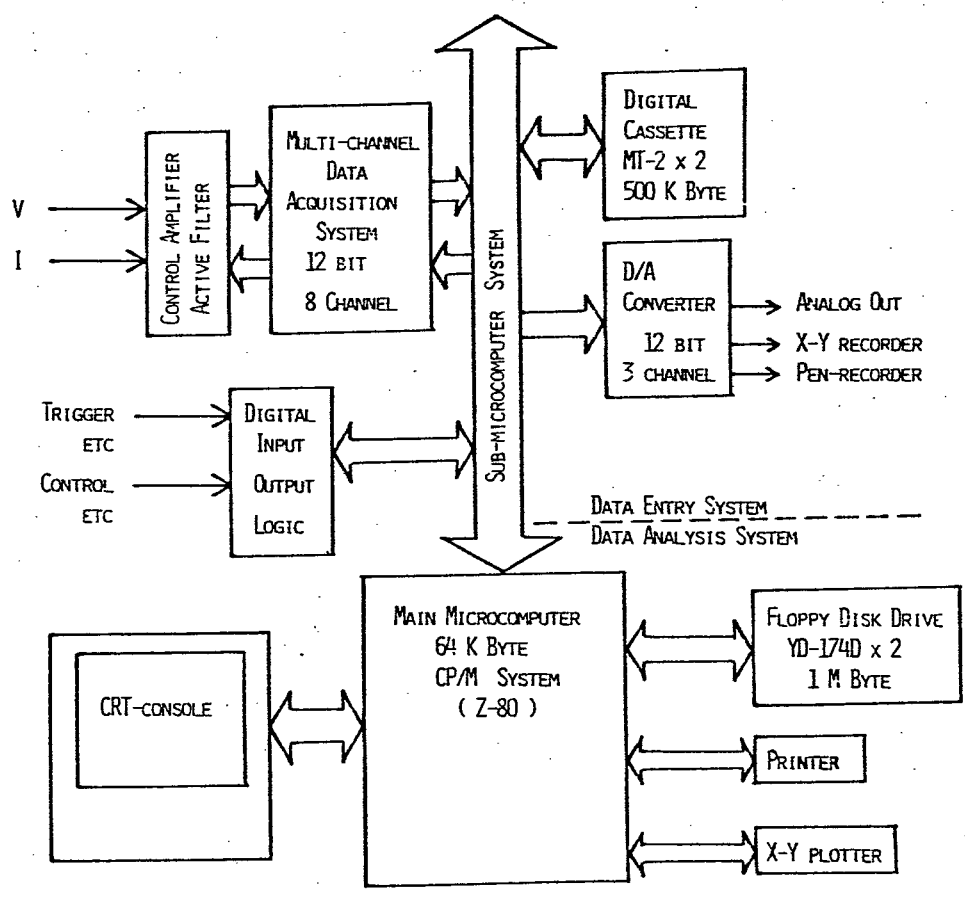


図 2-5 データ解析システム

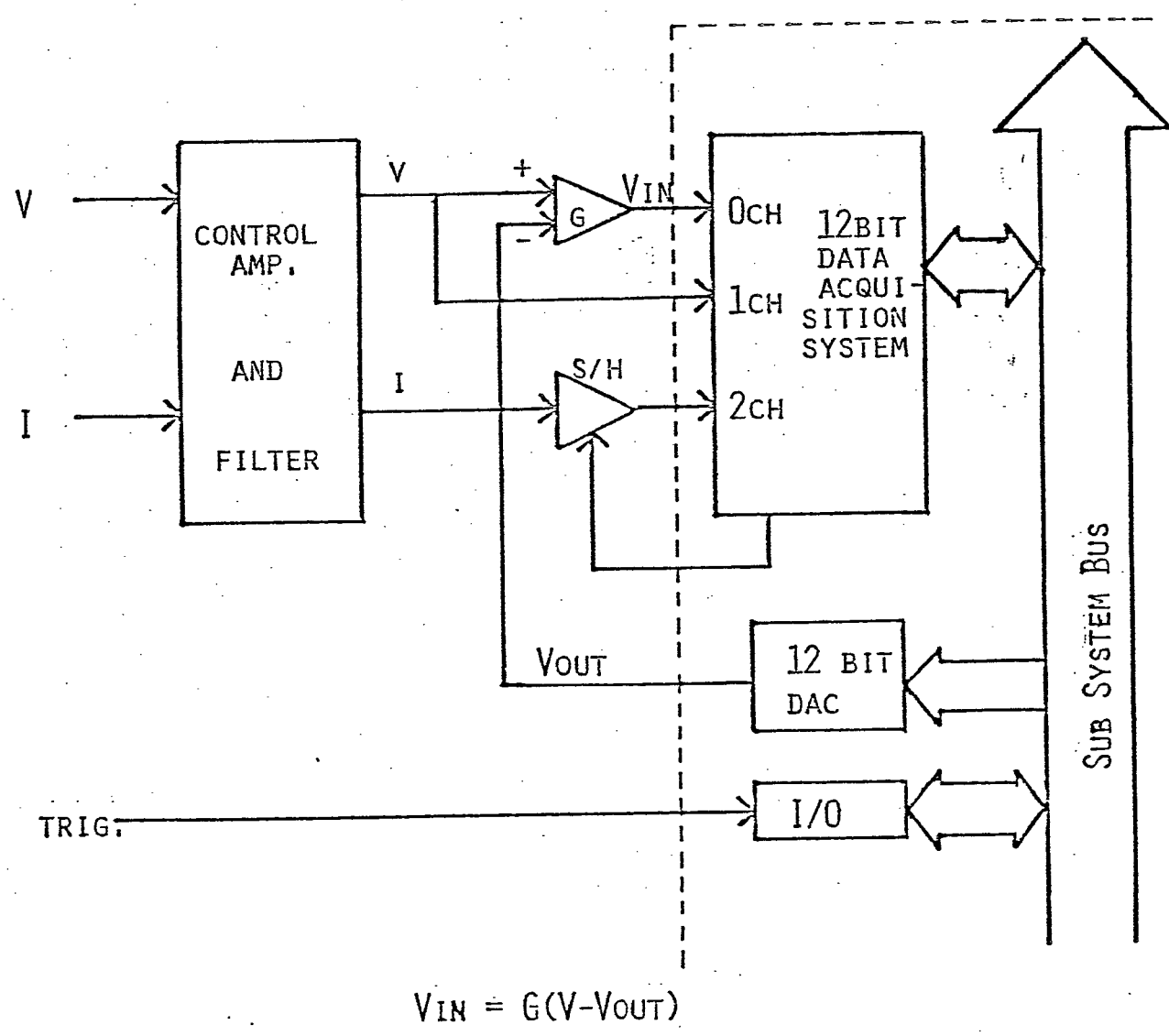


图 2-6 高分解能电压取达电路

ンシステムのフロッピーディスクに転送できる。データの再現性が非常によい。

電圧 V と電流 I は、マイコンに取込む前にオペアンプの高周波ノイズを除いたり、信号の大きさを適当にするために、コントロールアンプとアクティブフィルターを通す(図2-6)。フィルターのカットオフ周波数は 5kHz とした(アクティブフィルター DATEL社 FLT-U2)。トリガーとテストパルス、 V 、 I の関係を図2-7に示す。トリガーで波形発生器(波形の品質が非常に良い発振器(NF社 FG-121B)を用いた)から単発の方形波を出して、テストパルスとした。マイコンは、トリガーが出ると、取込み範囲の V と I を一定のサンプリング速度(1msec 前後)で、128点をそれぞれサンプリングして蓄える。1回の実験(たとえば1つの活動電位)で、32個のテストパルスを適当な間隔で取込める。1つのデータは12ビットなので、全部で16384バイトとなる。電圧のデータは適当に増やすだけで取込んでもいいが、 V の取りうる範

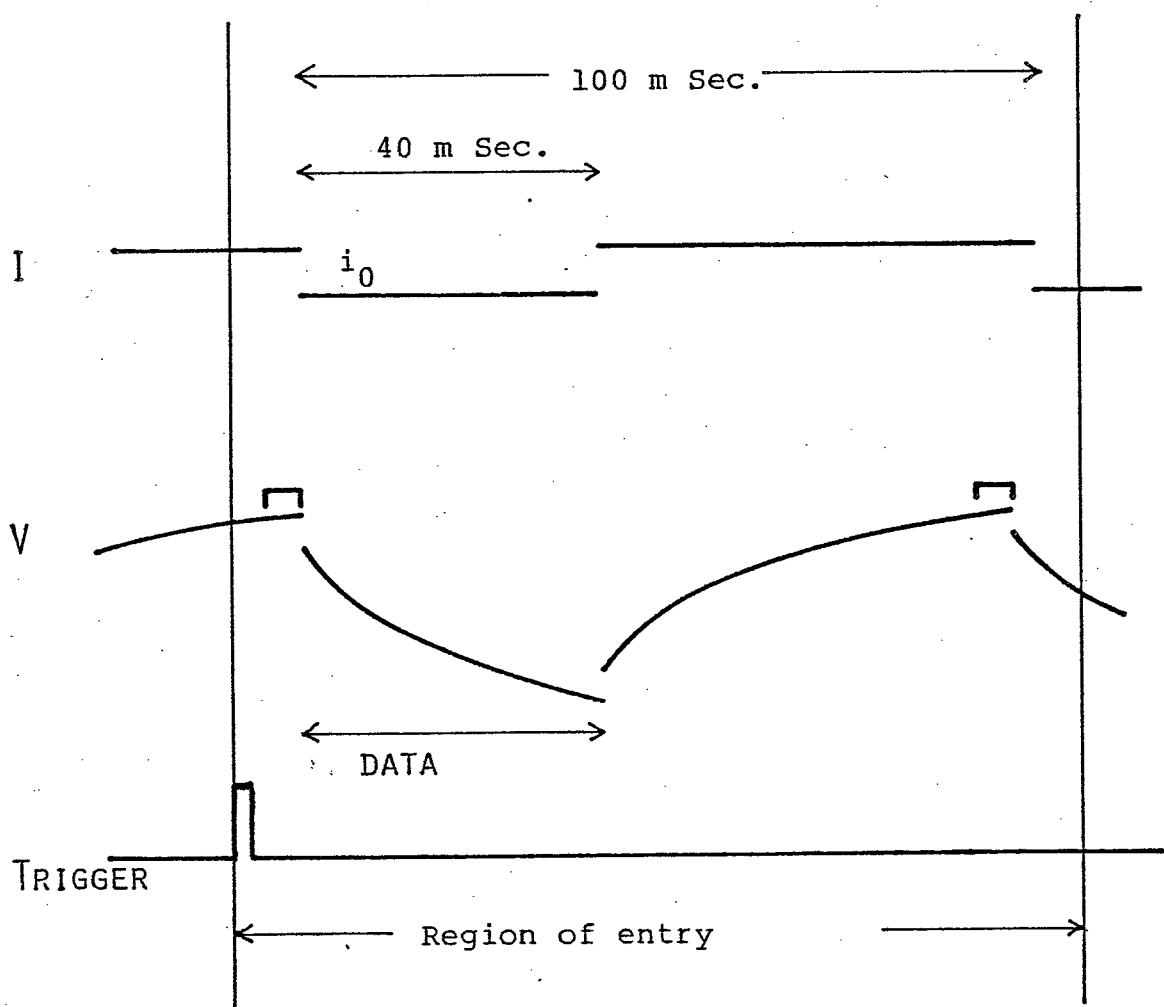
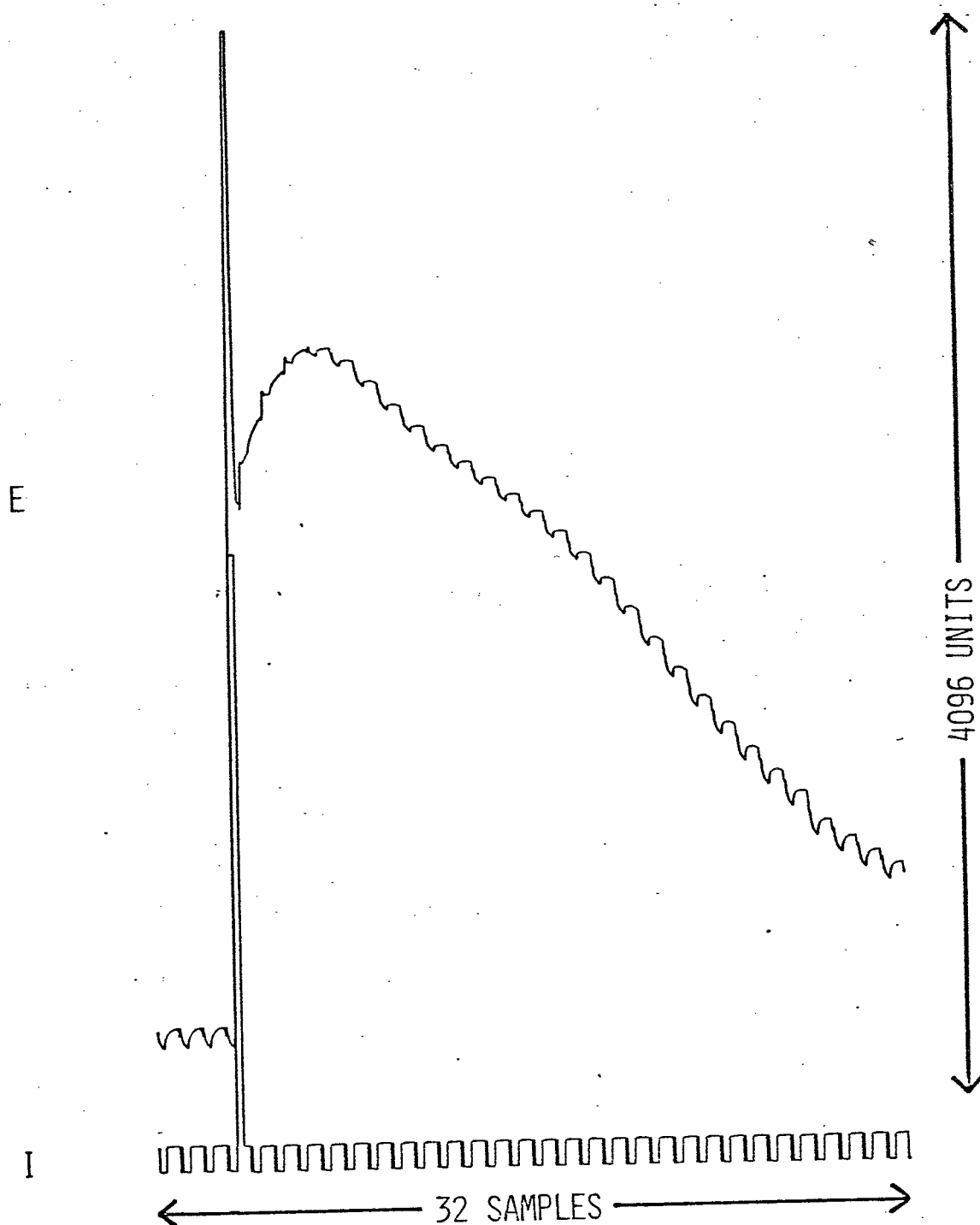


図2-7 トリガーとテストパルス、
電圧応答の時間関係の模式図

(i_0 はテストパルスの振幅)

用は $-250\text{mV} \sim +10\text{mV}$ で、テストパルスに対する応答は、数 mV 程度で、A/D変換器のダイナミックレンジのほとんどが、膜電位の大きさに取られてしまい、応答の部分の分解能が十分与えられない。この点を改善するための回路が図2-6である(図2-7も参照)。トリガー時の V を 1 CH から 1 個だけ取込む。この値を、下の 12 ビットの D/A 変換器からそのまま出力する。この出力は、取込み範囲の間、一定にしておく。この出力 V_{out} とテストパルスに対する応答を含んだ V との差をオペアンプで G 倍して 0 CH から 128 点をサンプルルする。 $G \cdot (V - V_{\text{out}})$ とした V は、 G 倍分解能が上がる。この研究では、コントロールアンプのゲインも含めて $16\mu\text{V}/\text{unit}$ の分解能となった。I の取込み部にほいっている S/H (サンプルホールド回路) は、アクイジョンシステムが、一度に、1 個のデータしか入力できないので、 V をサンプルルしている時の電流値を保持するためのものである。

図 2-8 活動電位 (テストパルスの応答を
32 個つないだもので、テストパルスは 0.2 秒毎)



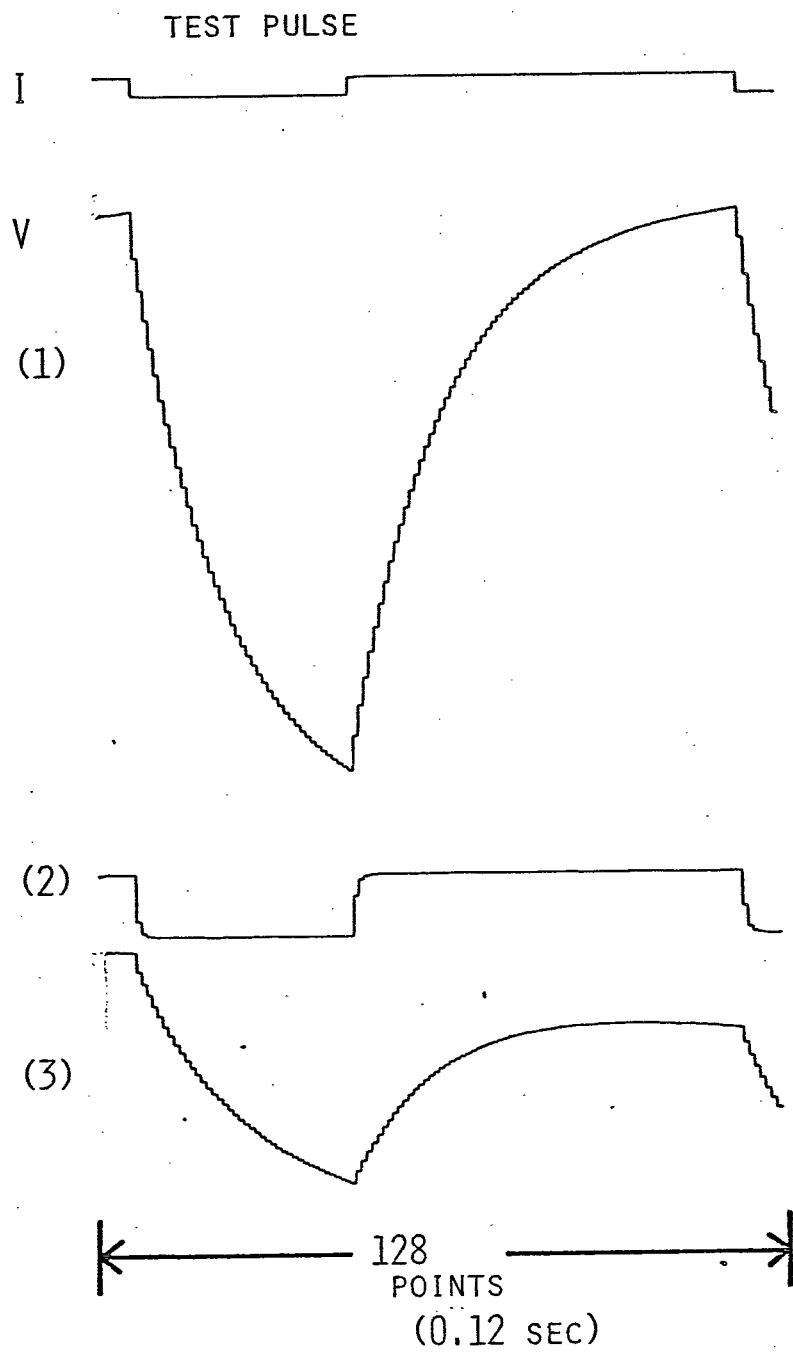


図 2-9 テストパルスに対する種々の応答の模式図

図2-8は、サブシステムに取込まれた応答を32個つなぎ合せたもので、この例では、Vのゲータ引きをしていない。この応答の一つ一つを見ると、活動電位のピーク付近で応答の振巾が、一過的に減小しているのがよく判る。図2-9は応答の例である。(1)が静止時、(2)が活動電位のピーク、(3)が活動電位のモどりの時の膜起電力の変化分が重畳されている時に、それぞれ相当する。(2)の振巾が小さくたつて時定数が小さくたっている場合は、一般に、膜コンダクタンスの上昇を表わしている。

2-6 データ解析

データ解析のためのメインシステムの概要を説明する。CPUにZ-80A, 64Kバイトのメモリを持つワンボードマイコン, 8インチ両面単密度のフロッピーディスクドライブ2台(容量1Mバイト), プリンター, プロッタ, コンソ

ール(NEC PC8001 を2400ボアのターミナルとして使用し、システムとの会話をを行う)で構成されている。現在世界的に広く利用されている、80系ディスクオペレーティングシステム CP/M (デジタルリサーチ社)を用いて、複数の言語プロセッサを実行している。プロセッサとして、マイクロソフト社の、マクロアセンブラ MACRO-80, BASIC インタプリタ BASIC-80, BASIC コンパイラ, フォートラン コンパイラ FORTRAN-80 が使用できる。カーブフィッティングは BASICで行うが、通常マイコンで使うインタプリタでは、プログラム開発には便利だが、実行速度が遅い。そこで完全に出来たプログラムをコンパイルして実行すると、非常に速くなる。ちなみに、サブシステムの BASIC インタプリタでカーブフィッティングを行うと、90分程度時間がかかるが、メインシステムでコンパイラを使うと、同じプログラムで、数分で、32個の応答に対して、カーブフィッティングが終了した。オッシロの写真解析では、一周間以上を要するので、画期的

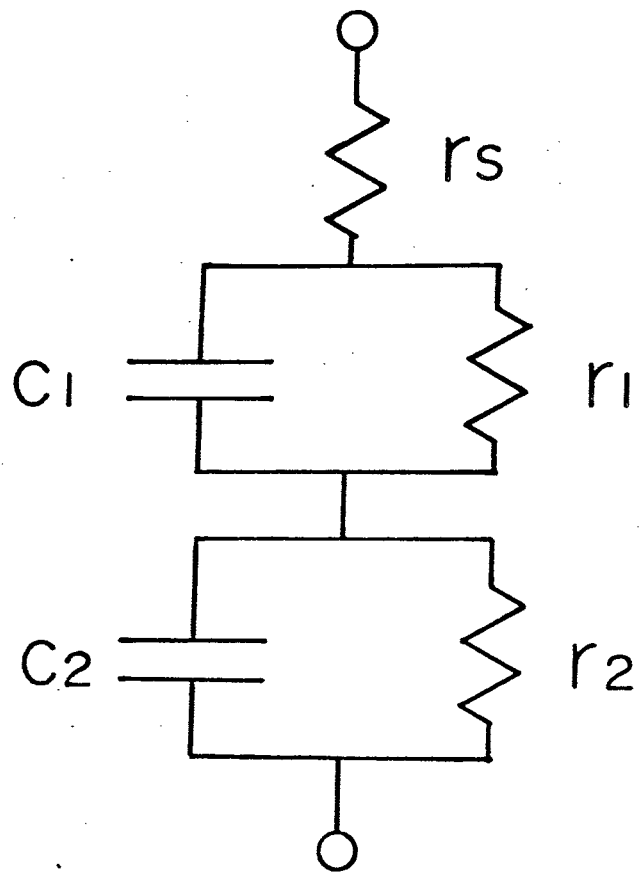


图 2 - 10

に速く行っている。

膜コンダクタンスを決める手順は、(図2-7)

i) テストパルスに対する応答には、図2-9(3)の様に E_m のレベル変化を含んでいる(特に、活動電位の経過中では顕著となる)。この成分を除くために、この範囲では、 E_m の変化が直線的であるとして、図2-7のVの2ヶ所の“ $\square$ ”の間で直線回帰をして、これを E_m の変化としてVから差引く。

ii) フィットting は、“DATA”の部分について行う。通常データ数は40~50個となる。

iii) フィットting は“DATA”に対して、1個あるいは2個の時定数を持つとして、逐次近似最小自乗法(著者の所属する研究グループで開発したプログラム)で行った。1つの時定数では、図2-4(b)、2つの時定数では、図2-10、の等価回路を用いた。図2-10では E_m は省略してある。

iv) フィットting で求めた、3ないし5個のパラメータから膜コンダクタンスを求める。同

時に他の定数も決定される。

抵抗とコンデンサで構成したダミー回路でテストを行ってみると、おどろくべき一致を示す結果を得た。

2-7 膜コンダクタンス

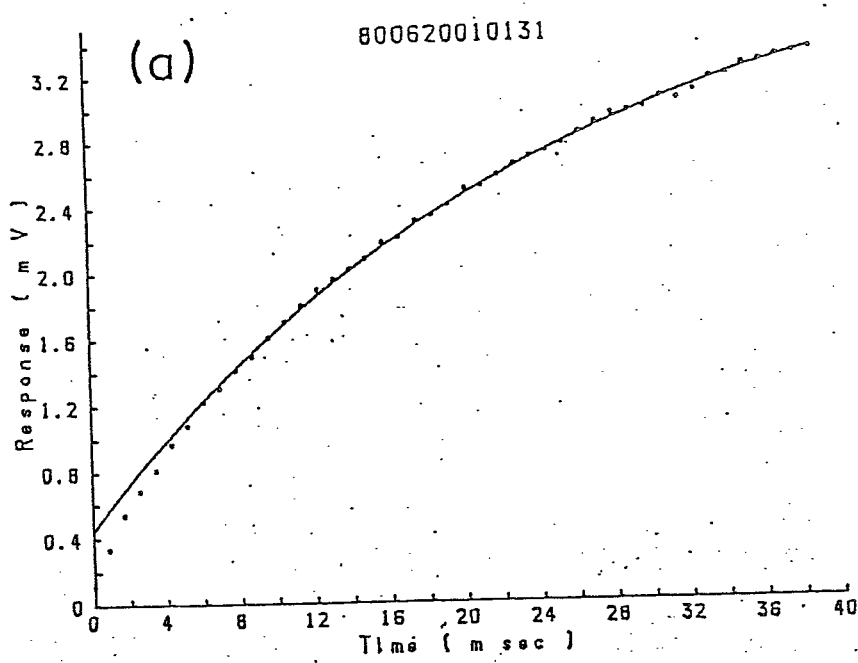
テストパルスの電圧応答に対するカーブフィッティングの例を図2-11に示す。テストパルスは小さく ($0.182 \mu\text{A}/\text{cm}^2$)、その中は、 38.6 msec である。いずれも、点がデータを示し、実線が計算値を示す。(a)はデータの後半 $2/3$ を使って一個の時定数で決めた場合である。前の $1/3$ が一致していない。

$$V(t) = 4.334 - 3.84 e^{-0.035t}$$

[1]

($V(t)$: mV, t : sec)

(b)は、データ全部を使って、標準偏差SDが最小となるように、一個の時定数で計算した場合で、全体を通じてフィッティング結果が十分



38

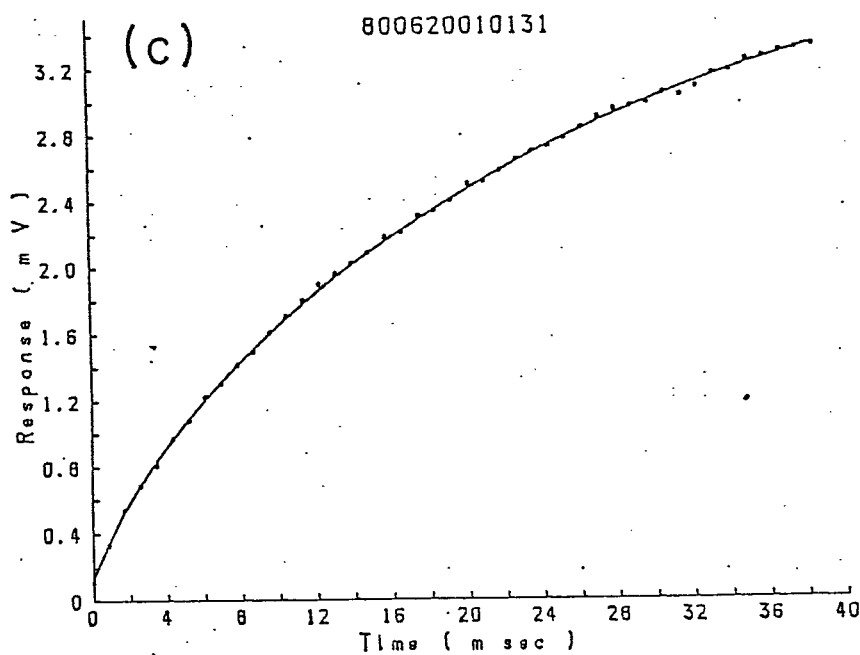
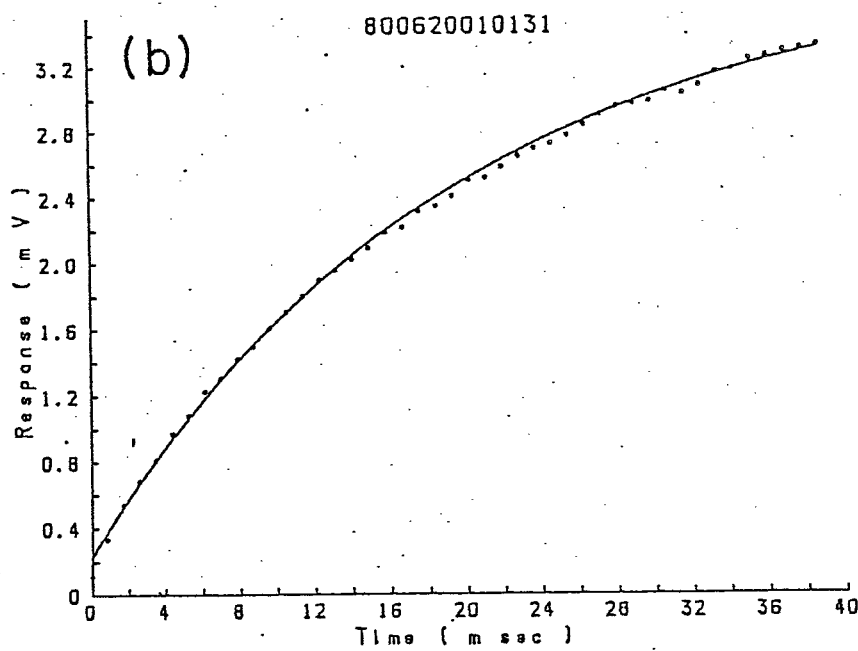


図 2-11 カーブ フィッティング (点, : データ, 実線 : 計算)

満足すべきものではない

$$V(t) = 3.848 - 3.616 e^{-0.0477t} \quad [2]$$

(c)はデータ全部を使って、2個の時定数モデルで計算した例で、(a),(b)と比べると、極めて満足できる一致を示している。SDも極端に減少し、(b)の場合の1/5以下となった。

$$V(t) = 4.334 - 3.83 e^{-0.035t} - 0.388 e^{-0.36t} \quad [3]$$

(2)と(3)を比較すると、係数や時定数が少しく異なっている。原形質膜のコンダクタンスを表している2項目の係数が(2)式の方が小さくなっている。すなわち、一個の時定数モデルではコンダクタンスが、大きめに計算されている。一個の時定数よりも、2個の時定数モデルの方が、SDを小さくできるので、2項目を原形質膜のコンダクタンスを求めるためのデータとした。3項目は、一応、液胞膜の成分と考えられる。2項目の係数と、3項目の係数の比(約10)は、原形質膜と液胞膜を別々に測定した Findlay and Hope (1974)の結果に近い。

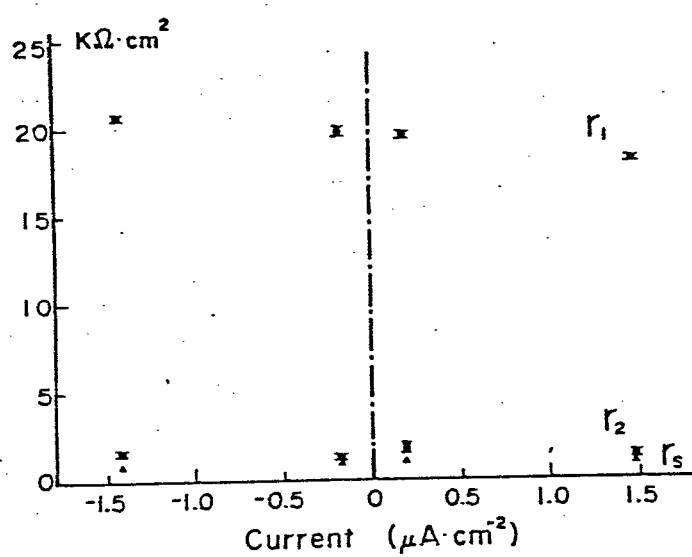


図 2-12 テストパルスの振幅と膜の抵抗成分の関係

図 2-12 は、テストパルスの極性と振巾を変えた場合の原形質膜の抵抗 r_1 と、液胞膜の抵抗 r_2 とシリーズ抵抗 R_s の変化を示す。テストパルスの振巾が小さい時($\pm 0.1 \sim 0.2 \mu A/cm^2$)では、脱分極側と過分極側で r_1 はあまり変わらないが、大きい時(約 $\pm 1.5 \mu A/cm^2$)ではかなりはずれてくる。即ち、整流性があらわれてきている。したがって、 $0.1 \sim 0.2 \mu A/cm^2$ 程度の過分極パルスを与えるのが適当と考えられる。

3 起電性イオンポンプ

3-1 ポンプと阻害剤

シヤジクモ節間細胞の起電性ポンプは1章の緒言で述べた様に、 Mg -ATPを基質として、 H^+ を細胞外に排出する輸送ATPaseらしい。ここでは、細胞内ATP濃度を減少させる様な阻害剤を用いて、ポンプ活性を観察してみよう。この目的を果す阻害剤として2つの薬物を用いてみた。一つは、ミトコンドリアやクロロプラストのリン酸化の脱共役剤DNP(2,4-dinitrophenol)で、人工膜の研究から、 H^+ のイオンフォアとして働くことで知られている。もう一つは、ミトコンドリア、クロロプラストの F_1 、あるいは CF_1 におけるATP合成を阻害するエネルギー転換阻害剤TPC(Triphenyltin chloride)である。これらの阻害剤の実験は、光の効果を除外するために、暗条件で行った。

起電性イオンポンプが受動チャンネルと同様

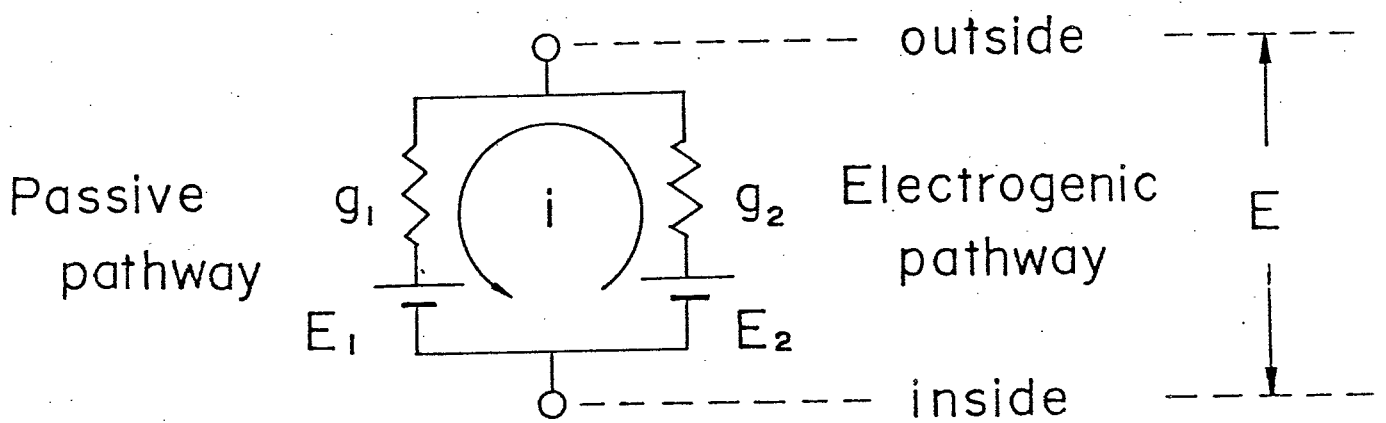


図 3-1 起電性イオンポンプを含む等価回路

に、内部抵抗を持った起電力として表現されることは、緒言で述べた。このことを電氣的等価回路で表わしたのが図3-1である。 g_1, E_1 は受動成分、 g_2, E_2 は起電性成分のコンダクタンスと起電力をそれぞれ示す。これはポンプ電流である。実験的に測定されるものは、 E と G なので、他のパラメータとの関係は、以下の式の様に表わされる。

$$G = g_1 + g_2 \quad [1]$$

$$E = (g_1 \cdot E_1 + g_2 \cdot E_2) / G \quad [2]$$

$$i = -g_2 \cdot (E - E_2) = g_1 \cdot (E - E_1) \quad [3]$$

もし、理想的な、ポンプの阻害剤を細胞に与えたとすると、起電性ポンプの成分だけが消失し、受動成分だけが残るはずである。すなわち、 E は式(2)だけで表わされる電位から E_1 に近づくことになる。コンダクタンス G も g_1 に近づくことになる。これは、理想的阻害剤を作用させたあとの E と G は、 E_1 と g_1 になることを表わしている。阻害の実験で求めた

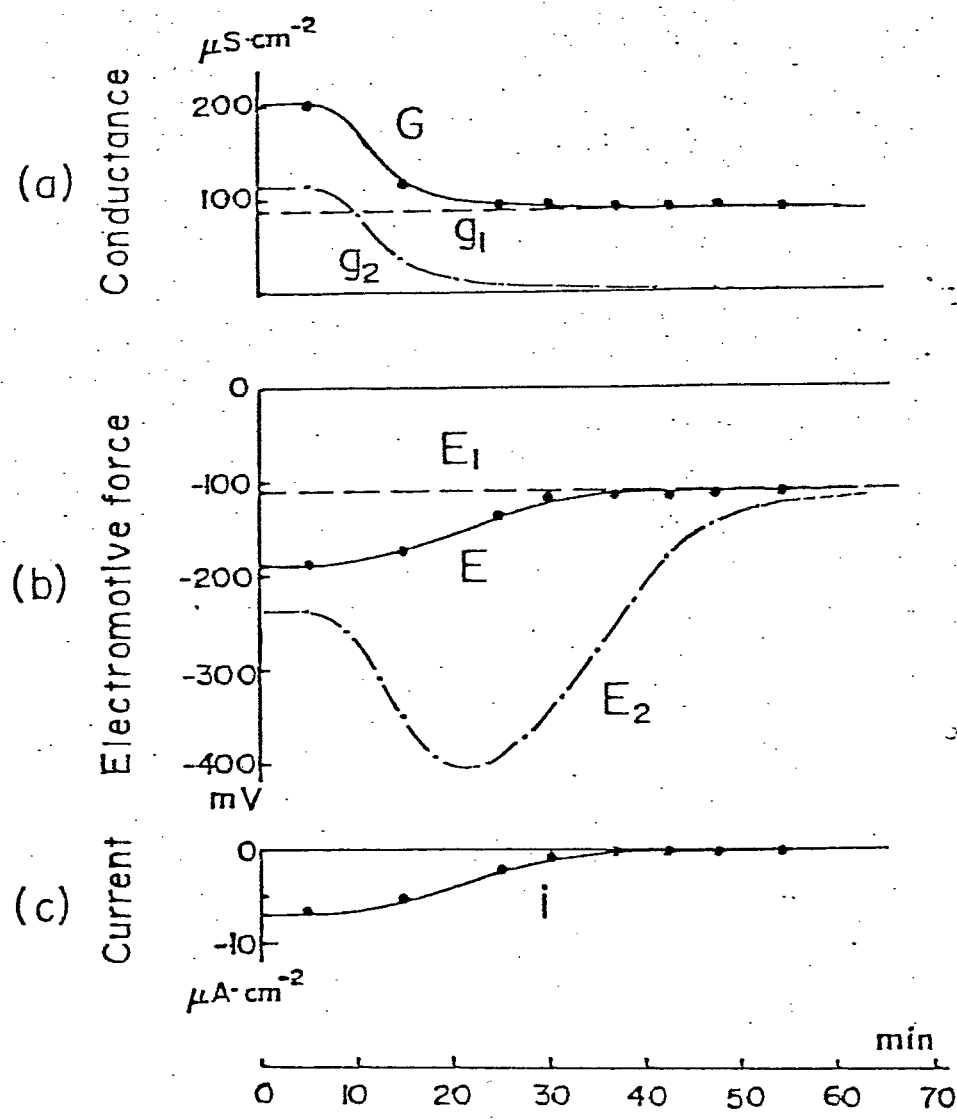


図 3-2 0.2 mMDNPで阻害した時のコンダクタンス(a), 起電力(b), ポンプ電流(c)の変化 [25°C]

E_1, g_1 を用いて逆に、阻害前の E_2, g_2 を求めることができる。すなわち (1), (2) 式から、

$$g_2 = G - g_1 \quad [4]$$

$$E_2 = (G E - g_1 \cdot E_1) / g_2 \quad [5]$$

となる。阻害の過程では、(3) 式の g_2 が減少してくるためにポンプ電流も減少することになる。阻害の過程における電位とコンダクタンスのレベル変化を見ることにより、ポンプの性質を観察してみよう。

i) DNP

阻害実験 30 分前から暗条件にしておいた節間細胞の外液 (APW, pH 7.0 MES) に 0.2 mM DNP を添加すると、約 15 分間で膜電位が -190 mV から -110 mV に脱分極した (図 3-2)。コンダクタンスは $200 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ から $85 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ に減少した。膜電位とコンダクタンス (E と G) はいずれも漸近的に、ある値に接近している。それぞれの漸近線の値を受動チャネルの g_1, E_1 とすると、式 (3)~(5) より、 g_2, E_2 が計算できる。図 3-2 の鎖線の様

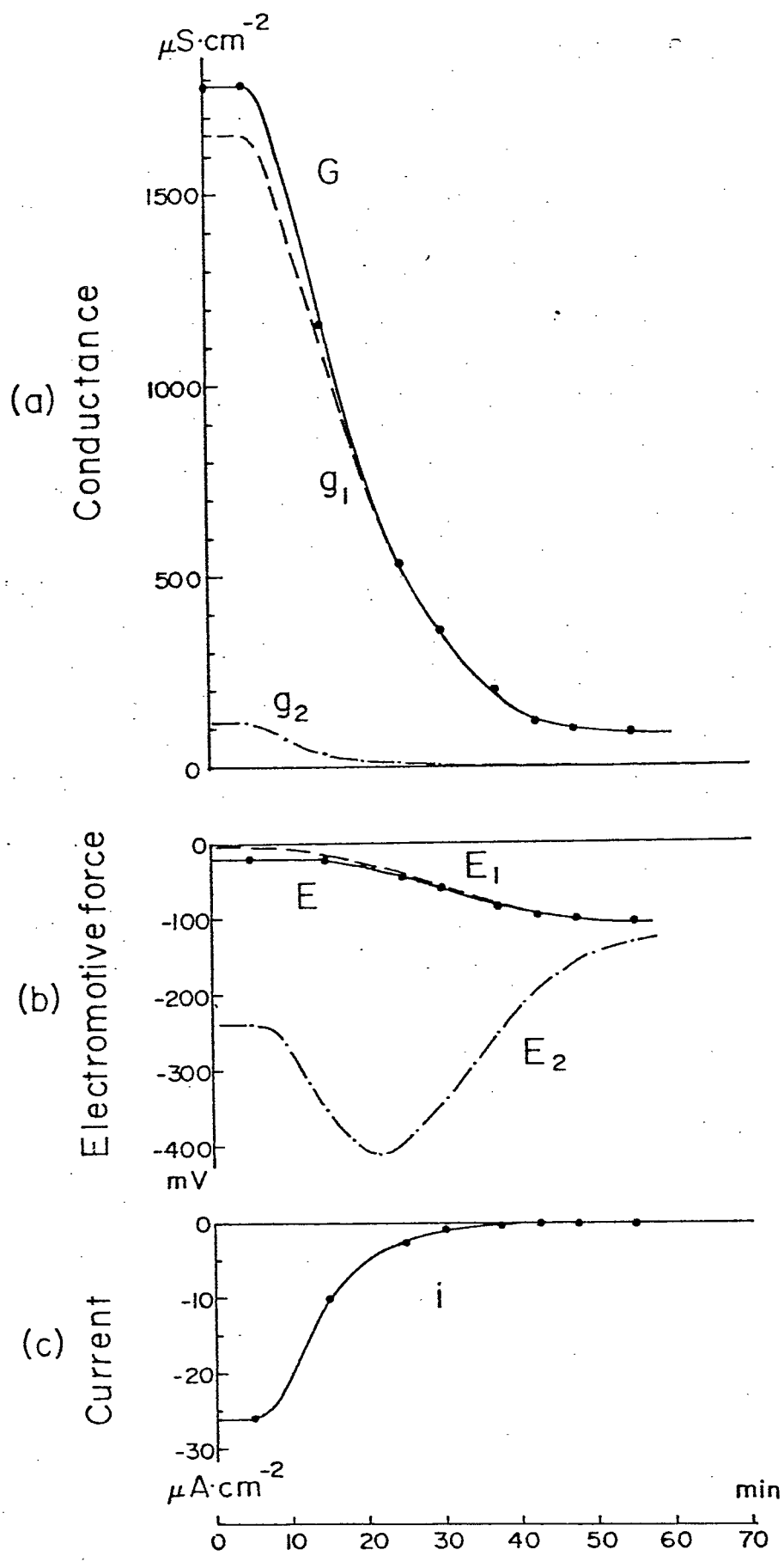


図 3-3 0.2mMDNP で阻害した時の活動電位ピークの
 コンダクタンス (a), 起電力 (b), ポンプ電流 (c) の変化.
 (図 3-2 と同じ材料)

になる。時間変化で面白いのは、 E_2 が一過的に過分極して脱分極することである。ポンプ電流は $-7\mu\text{A}/\text{cm}^2$ からゼロになっている。

DNP 阻害経過中、活動電位ピークがしだいに分極側に移動する(図3-3)。活動電位の振幅が小さくなってきて最後にでなくなる。(この例では50~60分後)。節間細胞に活動電位を出せると、膜コンダクタンスが数10倍に増大する。この増大は受動チャネルのコンダクタンスが増えることに対応している。もしポンプの g_2, E_2 が興奮によって変化せず、 V に依存しないとすると、活動電位ピーク時の g_1, E_1 の時間変化が計算できる(図3-3の鎖線)。 g_1 が $1650\mu\text{S}/\text{cm}^2$ から $100\mu\text{S}/\text{cm}^2$ 以下になっている。 E も -20mV から -100mV に分極している。DNP 阻害は、興奮時の、受動チャネルにも大きな影響を与える様にみえる。

DNP 濃度は、 0.2mM が下限でこれより低い濃度になると、ほとんど効果が無い。ミトコンドリアで通常用いられる濃度である。DNP

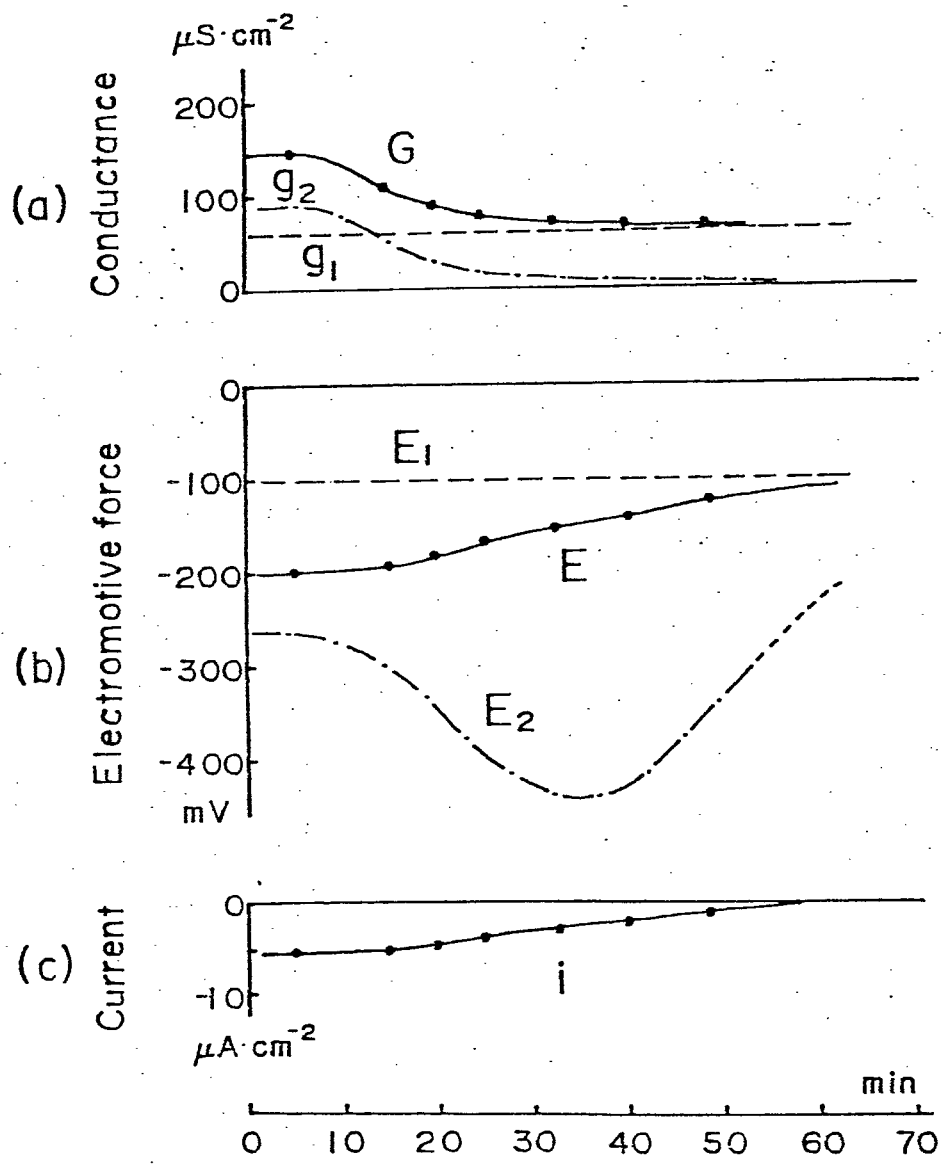


図 3-4 $2 \mu M$ TPC で阻害した時のコンダクタンス(a) 起電力(b), ポンプ電流(c)の変化 [25°C]

阻害は、DNPを除去して明条件(2000 lux)にしても、興奮性を含めて回復するのに長時間を要する。

ii) TPC

TPCは、ミトコンドリア、クロロプラストの F_1 , C_F に結合してATP合成を阻害するといわれている(Stockdaleら(1970), Gould(1976))。

暗条件下で $2\mu\text{M}$ ・TPCを含んだAPW (pH 7.7 Tricine)を流すと、膜電位は -200 mV から -100 mV に、脱分極し、膜コンダクタンスは $150\mu\text{S}/\text{cm}^2$ から、 $60\mu\text{S}/\text{cm}^2$ に減少する(図3-4)。DNPの場合と同様に漸近値を受動成分と考えて、 g_2, E_2 を計算した(図3-4の鎖線)。 $g_1 = 60\mu\text{S}/\text{cm}^2$, $E_1 = -100\text{ mV}$ とした。それぞれの変化の様子は、DNPの場合とよく似ており、 g_2 は指数関数的に減少し、 E_2 は、一過的過分極ののち脱分極する。ポンプ電流も同様に $-5.7\mu\text{A}/\text{cm}^2$ から、ほぼゼロになる。静止時のTPC阻害は、DNPの場合と比べて、定性的な差は見られない。

TPC阻害経過中の活動電位を見てみると、

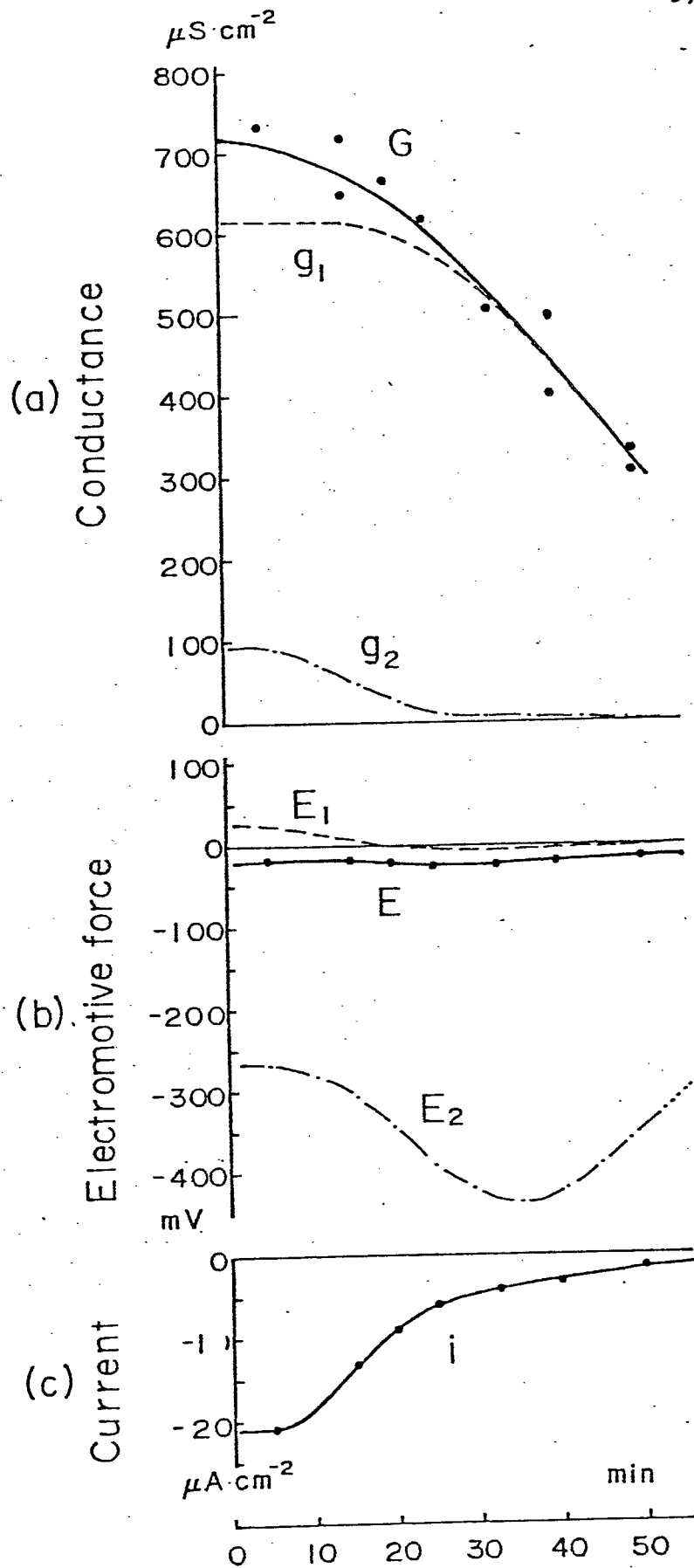


図 3-5 $2\mu\text{M}$ TPC で阻害した時の活動電位ピークの
 コンダクタンス(a), 起電力(b), ポンプ電流(c)の変化.
 (図 3-4 と同じ材料)

DNPと異なり、静止電位が脱分極しているのに、活動電位のピーク電位はほとんど変化しない(図3-5)。又、長時間阻害しても、興奮性が失われず、活動電位の振巾が80mVより小さくならない。DNPの時と同様に興奮性によって、 g_2, E_2 が変化しないと仮定して、 g_1, E_1 を計算すると、図3-5の鎖線のようになる。又、ポンプ電流も $-2\mu A/cm^2$ からゼロに減少している。この E_1 はほとんど変化していないし、 g_1 の変化も余り著しくない。TPCを除いて明にすると、 E, G が完全に回復する。TPC阻害が進んだ時点で明にすると、活動電位の大きさがほとんど阻害前の状態に戻る。TPC阻害がCF₁ではF₁にくらべて、かなり弱いことによると考えられるが、この点に関しては、まだよくわかっていない。DNPではこのようなことはない。

DNPもTPCも可逆的阻害という点では、同じように見えるけれども、阻害の内容について見ると、大きな違いがある。

a) 阻害剤濃度はいずれも効果を示す最小限濃度なのに DNP の効果の方がずっと早い。

b) DNP は興奮性を失わせる。

c) TPC は活動電位ピークをほとんど変えないし、ピークのコンダクタンス変化も小さい。

a) については、薬物を外から作用させているので、薬物の膜透過性の違いが含まれているかも知れないので、明確な議論はできないが、

b), c) については、DNP の方が TPC よりも膜の受動チャンネルに大きな影響を与えていることを示している。シャジクモでは、活動電位は主に Cl^- と K^+ の、2 種のイオンチャンネルの開閉によって、発生することが知られている。

DNP は、このチャンネルの開閉機構にも、阻害効果をもたらしている。このことは、章の最初に定義した、『理想的なポンプの阻害剤は、ポンプの成分だけに作用すること』に反している。TPC は、活動電位ピークのコンダクタンスが少し下がることを除くと、受動チャンネルをほとんど阻害していない。TPC は、

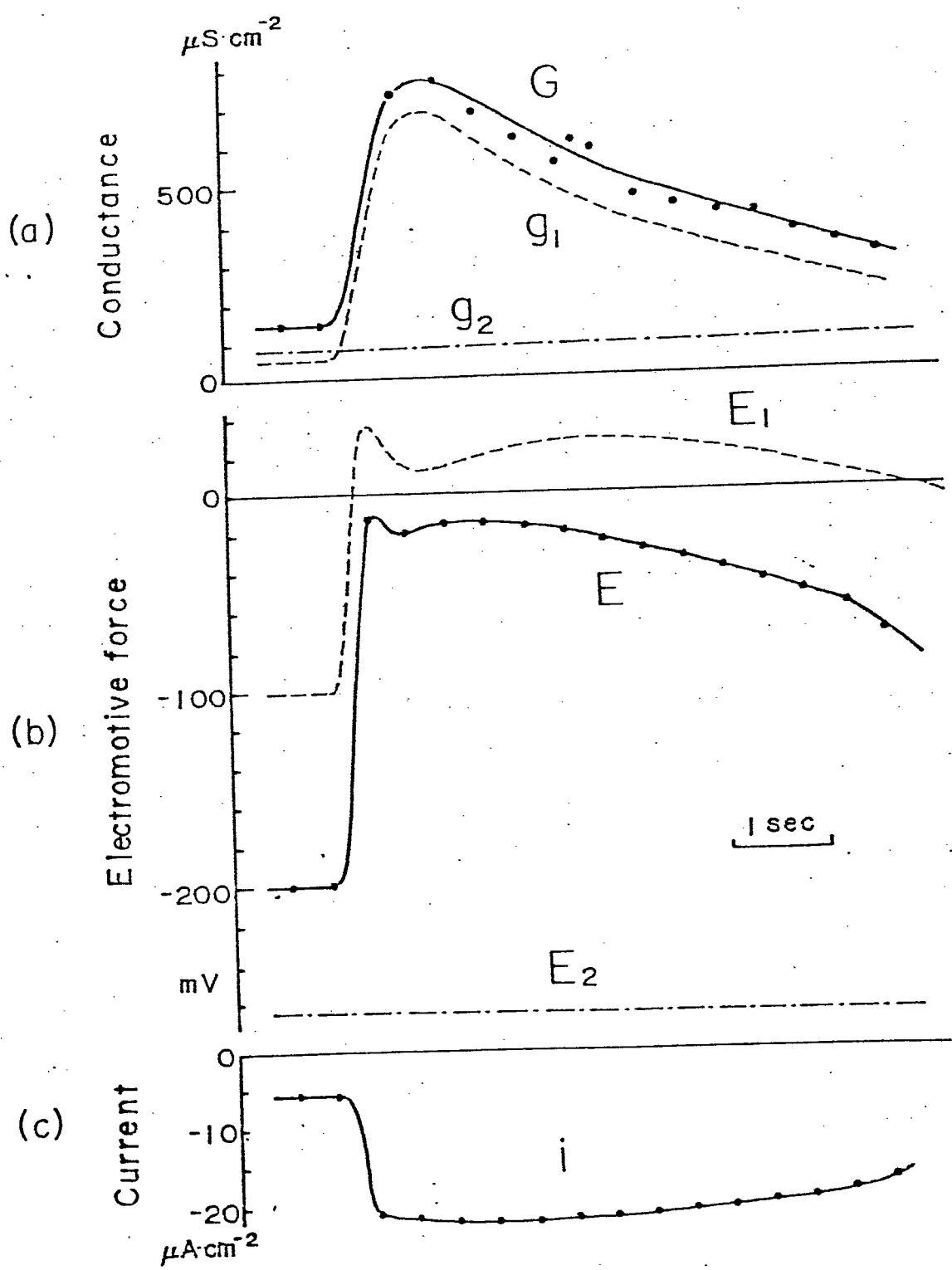


図 3-6 活動電位発生時の受動成分の変化
 コンダクタンス(a), 起電力(b), ポンプ電流
 (c). [g_2 , E_2 は 図 3-4 で求めた値]

理想に近いポンプの阻害剤として、十分に使用できる。

3-2 受動成分と起電性成分

電気生理学で、起電性イオンポンプの性質を論ずる上で、ポンプが受動成分からみて、どのような電流源となっているか、即ち、定電流源なのか、内部抵抗を持つ起電力なのか、という議論がある(緒言)。3-1で求めた、起電性ポンプの起電力 E_2 と、コンダクタンス g_2 は、それぞれ -267mV , $90\mu\text{S}/\text{cm}^2$ であった。膜のコンダクタンスは $100\sim 200\mu\text{S}/\text{cm}^2$ なので、膜コンダクタンスの60%程度が、ポンプの成分となる(3-1での例の場合)。又、ポンプの起電力 -267mV は膜電位より 70mV 程度過分極側にあるだけである。このことから、ポンプの成分は、定電流源ではなくて「内部抵抗と起電力が直列に接続された電流源」と表現することが合理

的であることを示している。

受動成分の E_i (-100mV) は、 K^+ の平衡電位 E_K (-180mV) よりも脱分極側にある。これは E_i が E_K だけで決ま、ているのではないくて、他のイオン、たとえば Cl^- , Ca^{++} , H^+ 等の項を含んでいる可能性を示唆している。活動電位発生時に、 Cl^- の透過性が上昇することが知られている。イオン濃度の点から Cl^- 成分が2番目の成分と考えられる。ちなみに、受動チャンネルには、 Cl^- と K^+ しかないとすると、 $g_K = 47.64\mu\text{S}/\text{cm}^2$, $g_{Cl} = 12.35\mu\text{S}/\text{cm}^2$ となる。6章の E_i の pH 依存性から、受動成分の g_H は小さいと考えられる。起電性ポンプによ、て流れ出る電流は、 H^+ を輸送しているが、その電流は、ほとんど K^+ と Cl^- として、受動チャンネルを流れる。結果として、外に残った H^+ が、外液の pH を下げることになる。

3-3 起電性イオンポンプと活動電位

膜の成分を受動成分と起電性成分に分けることができたので、活動電位発生過程での起電性ポンプの挙動について解析してみた。

図3-6は、静止時に阻害剤を使って測定した、 g_2, E_2 を用いて、興奮過程の各パラメータの変化を示す。動物細胞の活動電位はオーバーシュートが見られるが、シャジクモでは、一般に見られない。図3-6の E_1 の変化を見ると、約30mVオーバーシュートしている。又、 E_1 の変化中130mVは、神経細胞で一般に見られる活動電位の大きさとはほぼ等しい。又、ポンプ電流 $i = -6 \mu A/cm^2$ は、活動電位発生時には、 $-20 \mu A/cm^2$ にまで増大する。 i は、膜電位 E の変化を E_1 の変化からかなり強く過分極側に引っ張っている。

受動成分が主に、 K^+ と Cl^- だけで、構成されているとした時の g_K と g_{Cl} の変化は、図3-7の下半分の様になる。 g_K と g_{Cl} が両方とも活動電

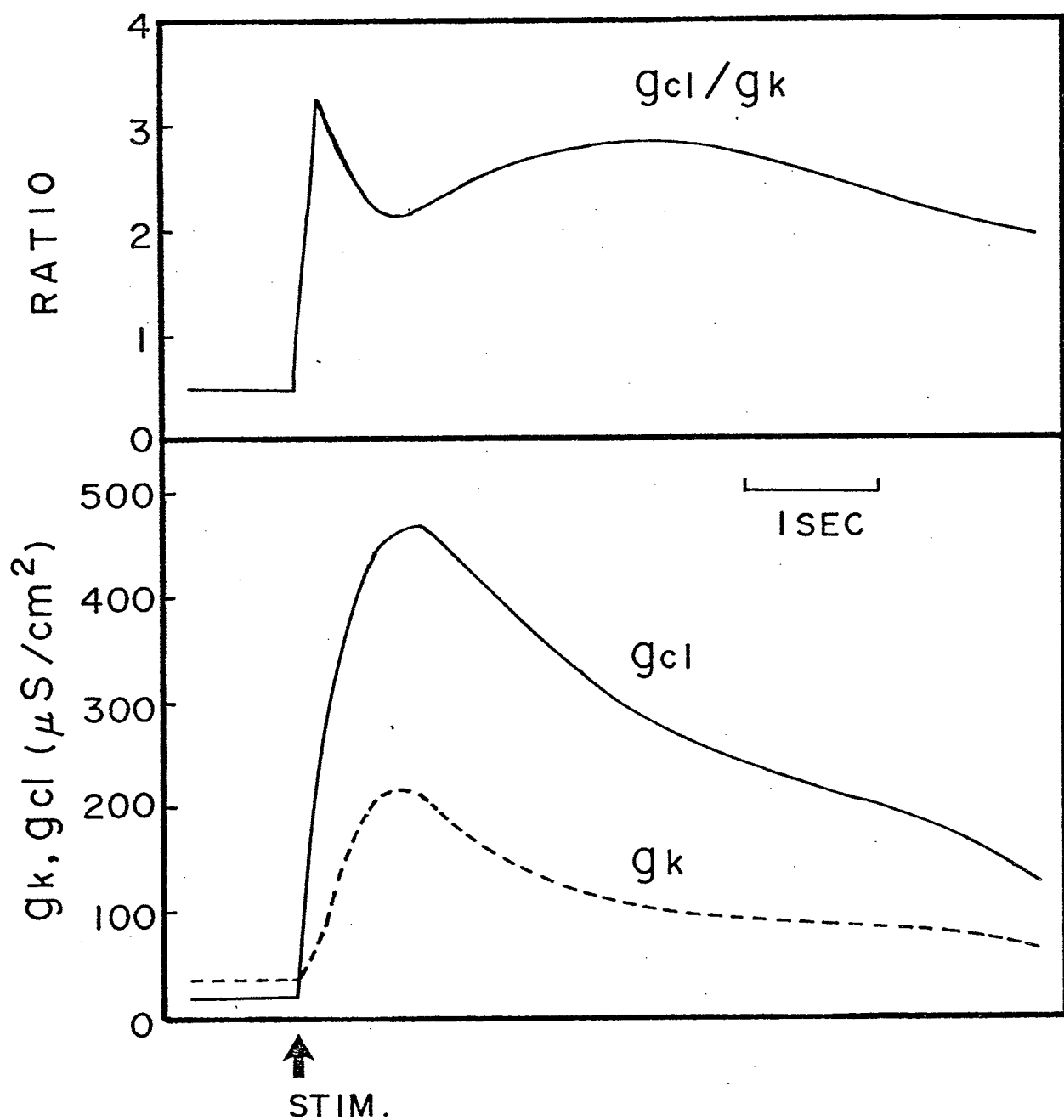


図 3-7 活動電位にともなう g_k, g_{cl} の変化と g_{cl}/g_k の変化 [図 3-6 のデータ]

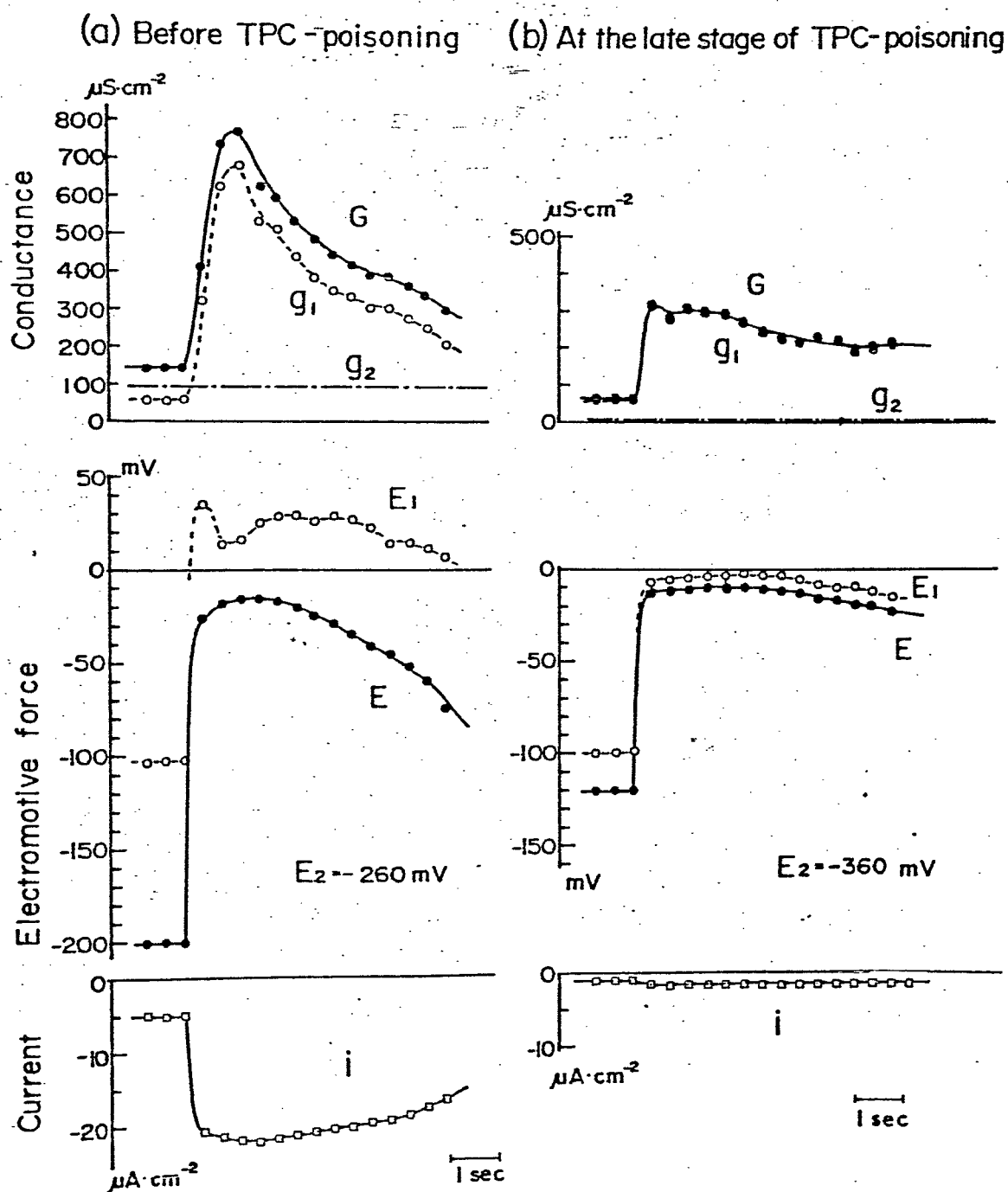


図 3-8 $2\mu\text{M}$ TPC 阻害前後の活動電位

位とともに、一過的に増大している。これは、シャジクモ、フラスモ(カラニテラ)の活動電位の立ちあがり、 Cl^- チャンネルが開くことだけで、決まっているのではなくて、 K^+ チャンネルも、ほぼ同時に開いていることを、示している。又、 g_k と g_{cl} の比が図3-6の E_1 の電位変化と非常によく似ている。 E_1 のピークと、 g_{cl} のピークが一致していないのは、活動電位のピークが g_{cl} と g_k の比によって決まっているからである。

TPC阻害をすると、活動電位の時間経過がしだいにのびてくる。図3-8(a)は、TPC阻害前の、コンダクタンスと起電力の変化、(b)は、TPC阻害がほぼ定常に至った時点での、コンダクタンス、起電力の変化で、まだ少し、ポンプ成分の効果が残っている。阻害前よりも、阻害後のほうが、全体のパラメータの時間変化や活動電位の戻りが、遅くなっている。

g_{cl} が、膜電位の関数で、過分極するほど、小さくなる(と考える(Na^+ チャンネルと同様のチャン

ネルと考える)と、ポンプ電流は膜電位を過分極側に引き上げているので、受動チャンネルのコンダクタンスを小さくするように働く。受動チャンネルのコンダクタンスが小さくなると電位が E_2 の方向に引き上げられるので、活動電位をはやくおめらせようとする力になっているのかも知れない。TPC 阻害後では、この復原力がほとんどないために、活動電位が、戻りにくくなって、全体の時間経過を遅らせていると思われる。

4. 阻害剤と細胞内 ATP 濃度

4-1. 細胞内 ATP 濃度

起電性イオンポンプは ATP を加水分解することによって生じる自由エネルギー変化を使って H^+ を起電的に外に排出している。3章で起電性ポンプの阻害に用いた DNP, TPC はいずれも、ミトコンドリア、クロロプラストの、ATP 合成を阻害する薬物である。そこで、ポンプ活性と細胞内 ATP 濃度の関連を調べるために、電気生理の場合と同じ条件下での ATP 濃度の変化を測定した。又、ATP 加水分解に関係している他のアデニンヌクレオチドの変化についても測定した。

4-2. 細胞内 ATP 濃度測定法

ATP 定量はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた宮本ら (1976) の方法によった。

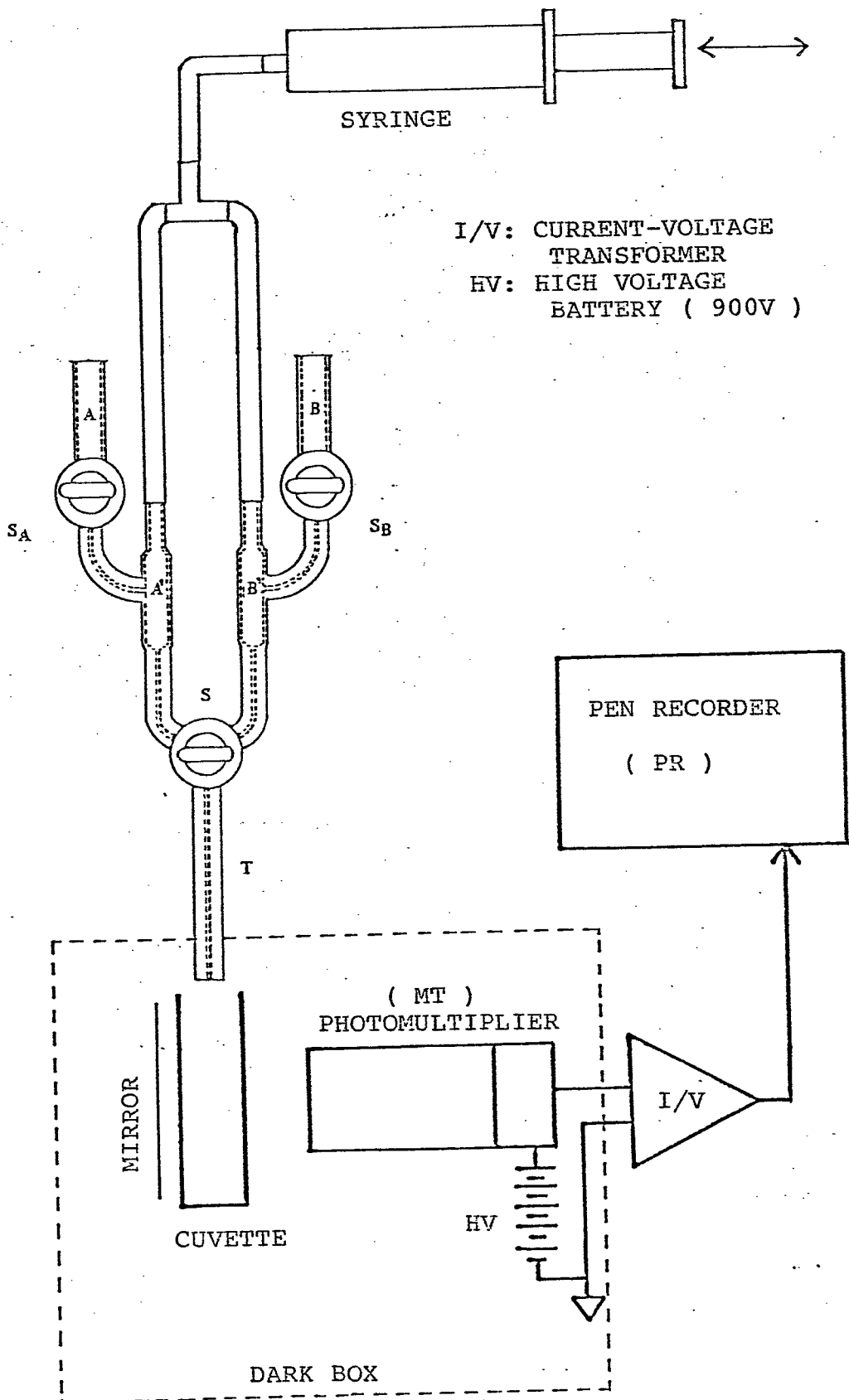


图 4-1 ATP 定量装置

a) ルシフェリン - ルシフェラーゼ反応液

FLE-50^{注)} (シグマ社) のバイアル瓶に 6 ~ 10 ml の水を加えて溶解して、リン酸三カルシウム $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 1 g を加えてよく攪拌したのち、室温で 10 分間静置する。上清を遠心してリン酸三カルシウムを完全に除いたものを反応液とする。

注) FLE-50: ホタルの発光器管を緩衝液中でホモゲナイズし、凍結乾燥したもの。ルシフェリン、ルシフェラーゼを含有し、ATP を加えれば発光する状態になっている。

この反応液は、このままでは、発光が速くすすみすぎる。測定の便宜上、反応をおそくする目的で、硫酸緩衝液と、ATP と Mg-ATP にするために、 MgSO_4 を一緒に混合する。

b) 測定装置と測定手順 (図 4-1)

図中央の混合セルで混合した液をキュベットで受けて発光の強さを光電子倍增管 (PM)

で測定した。

コック S_A , S_B , S を閉じて、 A に、 0.2 M 砒酸ナトリウム液 0.4 ml + 反応液 0.4 ml , B に、 0.08 M MgSO_4 0.4 ml + 測定液 0.4 ml を入れる。

S_A と S_B を開いて、それぞれの液を A' , B' に吸入する。 S_A と S_B を閉じて注射筒で圧力を加える。3方コックの S を開けて、 A' , B' の液を混合して T を通してキュベットで液を受けて、 PM で発光の強さを測定してペンレコーダーに書かせる。発光の強さのピーク値をデータとする。ATP 濃度の測定範囲は、 $10^{-8} \sim 10^{-3}\text{ M}$ で、この範囲内で十分直線性があった。又、

ADP, AMP は、Kimmich ら (1975) による酵素法でこれらを ATP に変換して測定した。

(c) 測定液作製手順

節間細胞は、測定1日前にとなりの細胞から切り離し、APW 中で自然光下においた。それぞれの細胞の直径と長さを測定したのち、試験管に試験液 (APW あるいは、APW + 阻害

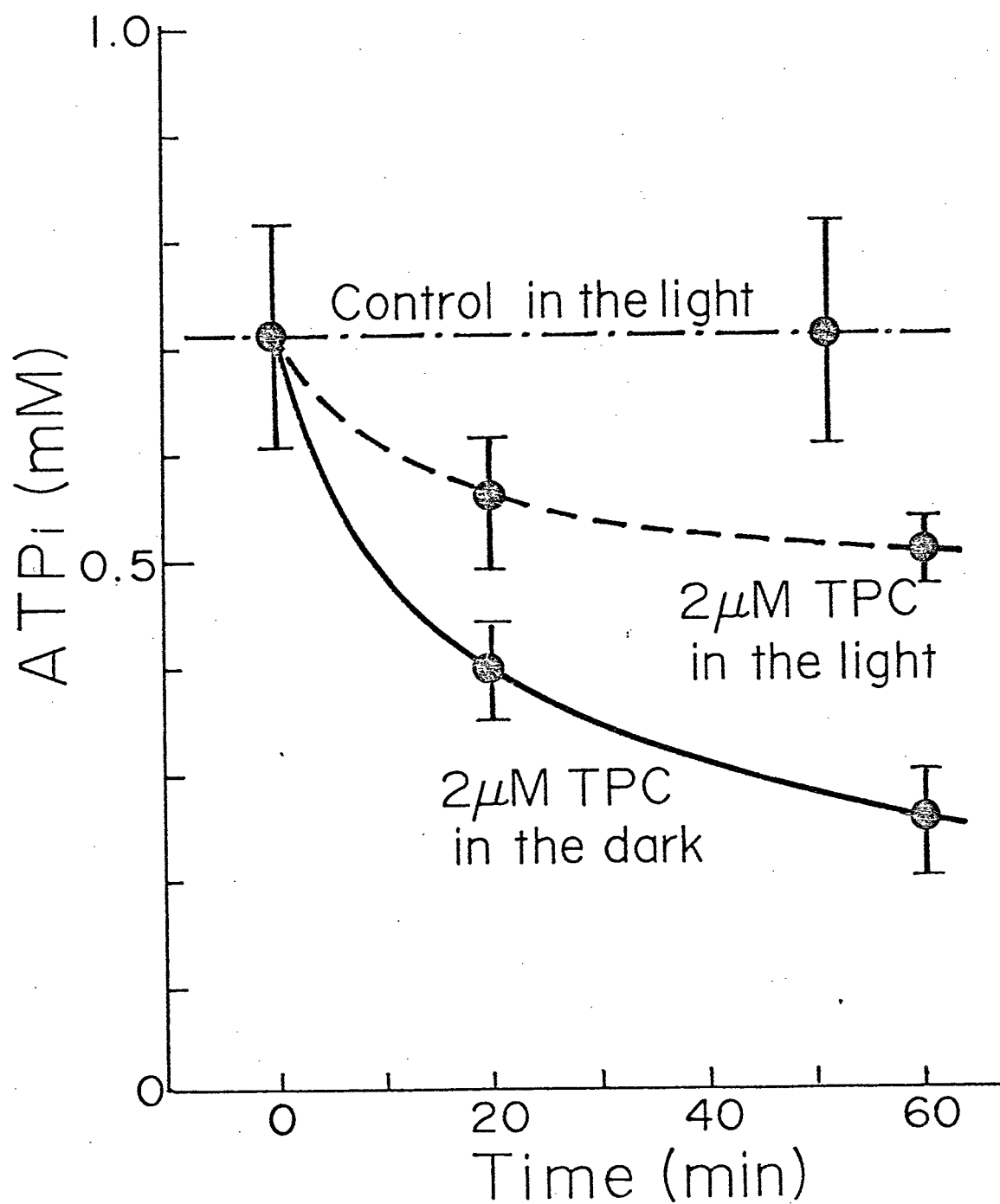


図 4-2 TPC阻害による細胞内ATP濃度の
時間変化

剤) と共に入れて 20°C でインキュベートする。一定時間ごとに取り出した試験管を 100°C , 10 分間の熱処理をして、ATP を細胞外に抽出する。同時に、ATPase 活性、ATP 合成の活性も消える。ADP, AMP も同時に抽出される。処理後ただちに凍結保存する。測定直前に解凍して測定液とする。Tazawa, Kishimoto and Kikuyama (1974) より、節間細胞の原形質量は、全容積の $1/10$ として、原形質中の ATP 濃度を求めた。各データは、5 サンプル以上の平均値と標準偏差とで示している。

4-3. 阻害剤の効果

a) 阻害剤による ATP 濃度変化

明条件で正常 APW 中での節間細胞の原形質内 ATP 濃度は、 $0.7 \sim 1 \text{ mM}$ であった。暗 + $2 \mu\text{M}$ TPC にすると、約 60 分で ATP 濃度が 0.25 mM にまで指数関数的に減少する(図 4-2)。

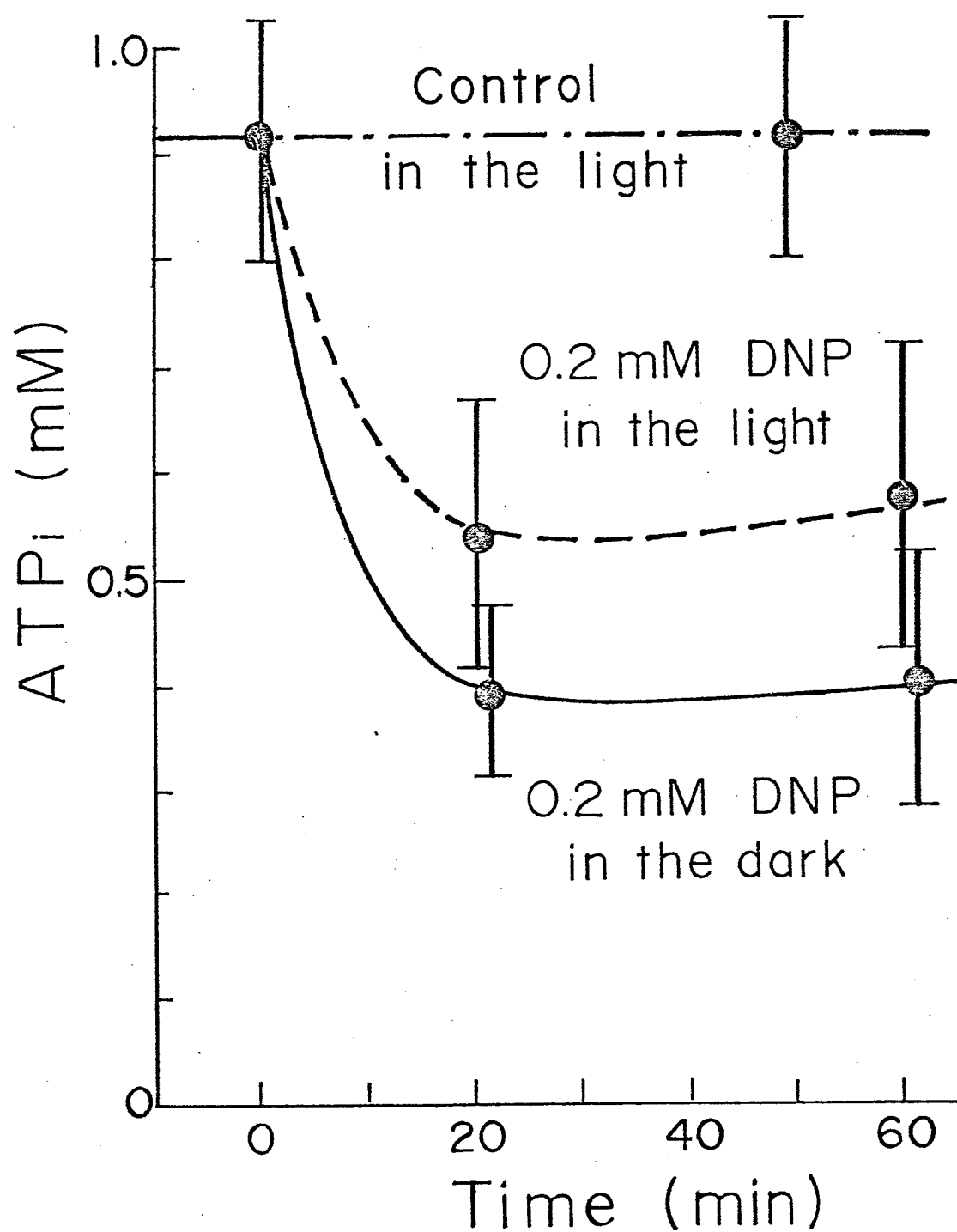


図 4-3 DNP 阻害による細胞内 ATP 濃度の時間変化

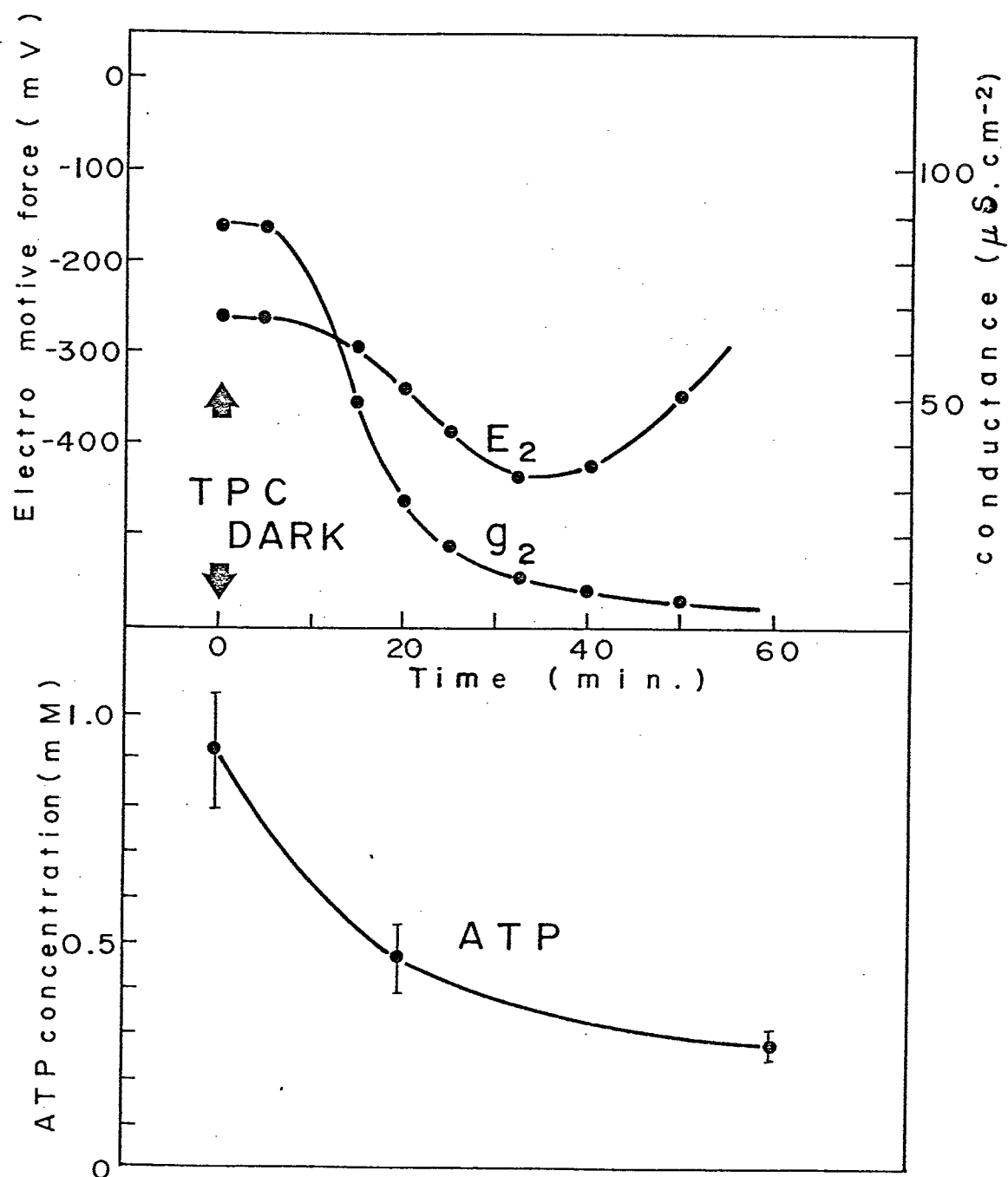


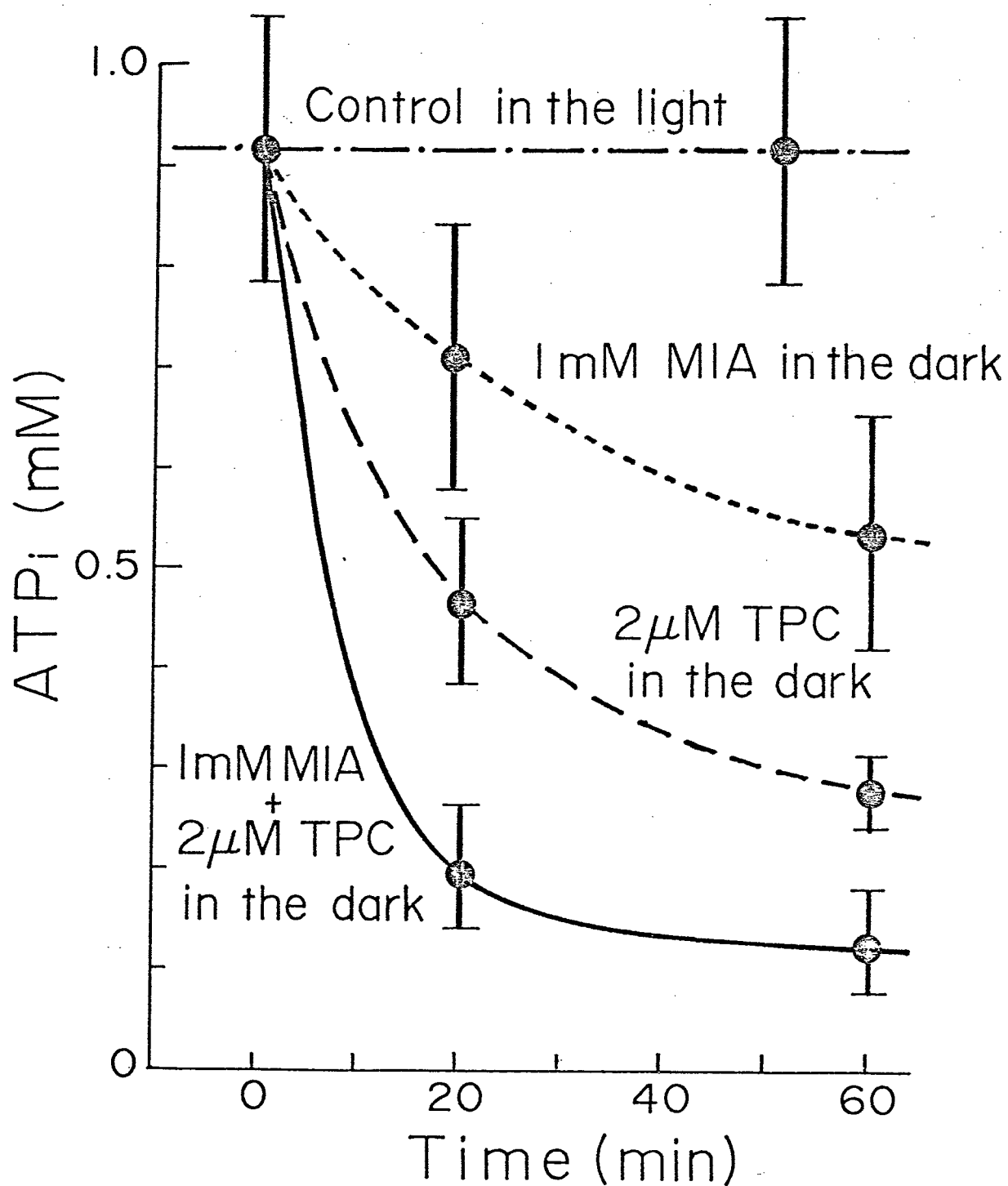
図 4-4 TPC 阻害による起電性ポンプ成分の変化と細胞内 ATP 濃度変化の関係

ポンプの阻害剤 TPC の効果で、すくなくともポンプ活性の阻害と ATP 濃度の減少がほぼ同じ時間のオーダーで起こっている (図 4-4)。明条件 + 2 μ M TPC では、図 4-2 の様に ATP の減少量が小さくなった (0.5 mM まで)。これは電気生理実験で明条件にしておくと、TPC の効果が少ないというデータの傾向とよく対応している。

同様の実験を 0.2 mM DNP について行なってみると (図 4-3), ATP 濃度が TPC の例の様に指数関数的に減少した。 (1 $\rightarrow$ 0.4 mM)。DNP も TPC の様に ATP 濃度を下げるが、変化が TPC よりも早い。このことは、電気生理実験のデータでポンプの阻害され方が早く受動成分にも影響をあたえていることと関連があると思われる。

TPC 阻害によるポンプ活性の阻害と ATP 濃度変化を対応させてみると (図 4-4)、 g_2 の時間変化とはよく似ているが、 E_2 の変化の仕方がことなっている。このちがいは、ポンプ

図 4-5 モノヨード酢酸 (MIA) と TPC による
細胞内 ATP 濃度変化



の機構を調べる上で重要な問題を含んでいる。ともかくも、ポンプ活性はATP濃度と十分に相関があり、TPC阻害の全部かあるいは一部がATP濃度の低下によってもたらされている。TPCとATP濃度のデータは、Keifer and Spanswick (1979) の示したcccp阻害とATP濃度の関係とも定性的によく似ている。

b) ATPはどこで合成されるか？

TPC阻害で減少したATPは主としてミトコンドリアの F_1 粒子上で合成されたものと考えられるが、阻害60分後の残り20~30%は、どこからくるのであろうか。そこで解糖系の阻害剤モノヨード酢酸(MIA)を用いて実験を行った。2 μ M TPCは60分で約30%にまで阻害するが、2 μ M TPC + 1mM MIAでは約14%にまでなる(図4-5)。又、1mM MIAでは約58%にまでしかならない。このデータから、大ざっぱに言えば、ミトコンドリアの酸化リン酸化で70%が作られ、解糖系で15%作ら

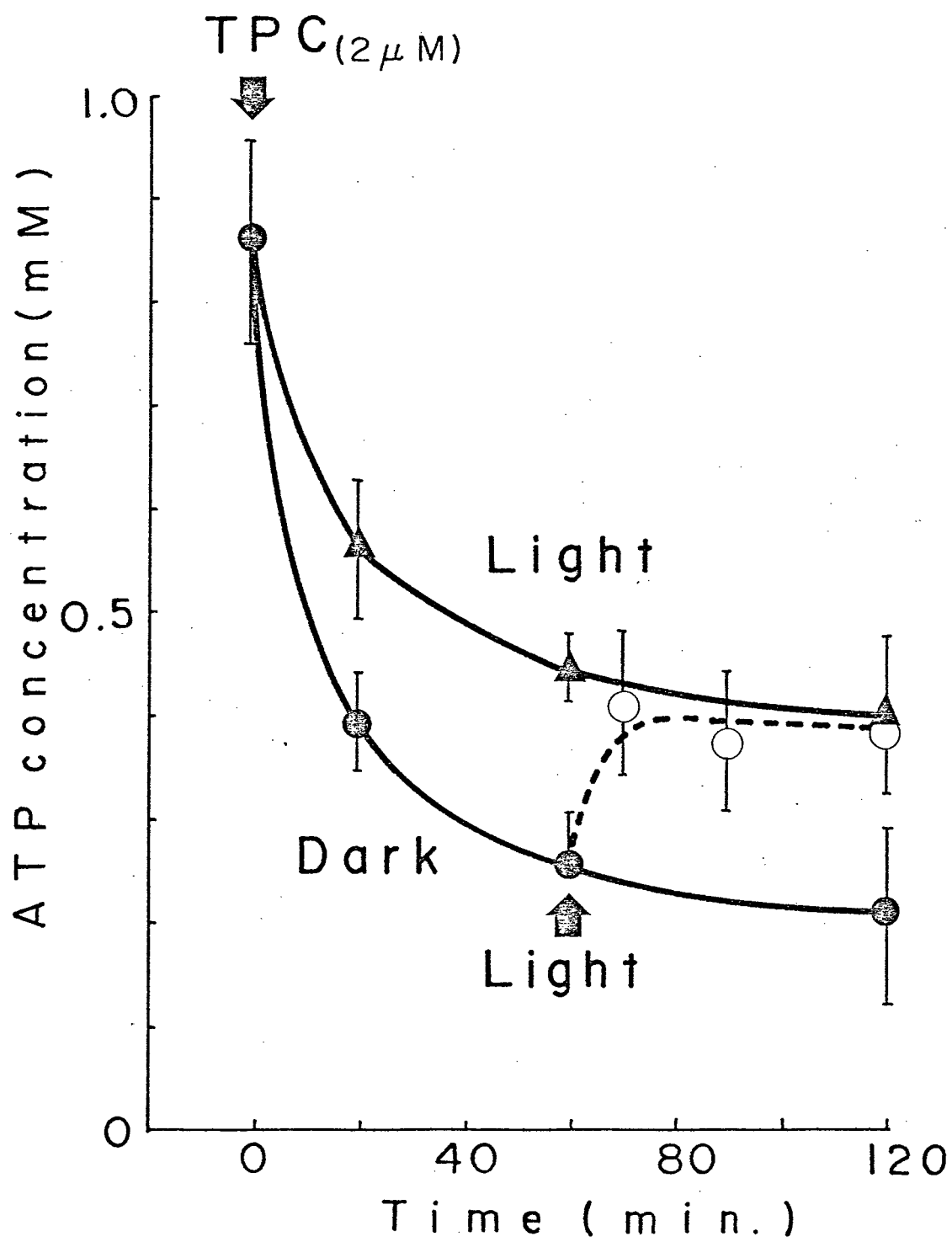


图 4-6 TPC 阻害と光条件

れている。ただ、この中には、クロロプラス
ト合成分と、構造に結合している部分も含ん
でいるかもしれない。MIA だけでは、58% に
しかならないのは、酸化的リン酸化の基質が
解糖系以外からもくることを示唆している。

電気生理実験では暗 + TPC で、ポンプが阻
害されている時に、明にすると阻害がなくな
る様に見える。途中で明にすると ATP 濃度は
、明 + TPC で阻害したのと同じレベルになる
(図 4-6 の点線)。 ρ_2 , E_2 がかなり回復す
るのに ATP 濃度が完全に回復しないのは、ク
ロロプラストと原形質の間の空間の ATP 濃度
が上昇するのに、原形質全体の ATP 濃度が上
昇するにいたらなかったためかもしれない。DNP,
TPC 阻害の時、明と暗の差は、それぞれの阻
害がクロロプラストでは完全ではなく、光が
あたると ATP 合成がまだかなり出来ることか
ら来ていると考えられる。またクロロプラス
ト内の ATP は内部ですぐに他に転用される可
能性も含んでいる。

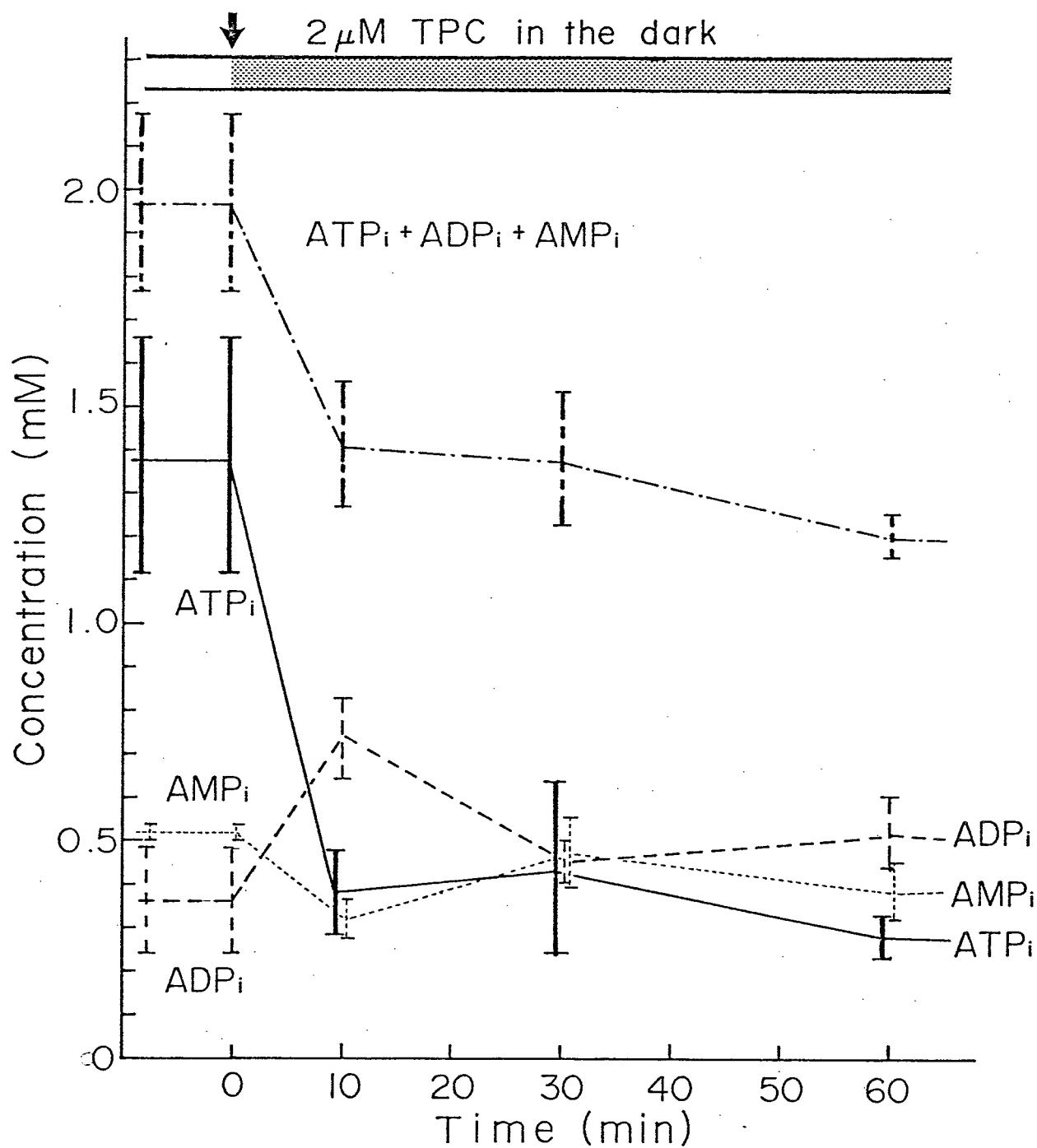


図 4-7 TPC 阻害によるアデニンヌクレオチドの濃度変化

ATPの加水分解反応の進行によって他のアデニンヌクレオチドの量の変化は重要な意味を持つ。TPC阻害によるATP, ADP, AMPの濃度変化はさまざまな様子を見せる(図4-7)。

i) ATP: 指数関数的に減少する。ii) ADP: 一過的に増大して減少する。iii) AMP: ADPが減少しはじめるとゆずかに一過的に増大する。

ADPの一過的増大は、ATPの急激な減少に対応している。AMPの一過的増大も同様にADPの減少に対応している。アデニンヌクレオチドの濃度変化の傾向は、アカパンカビで、

Slayman (1973) が 1mM シアンで阻害した場合の結果と非常によく似ている。アデニンヌクレオチドの合計が減少しているのは、ヌクレオチドの代謝が、ATP、ADP、AMPの間で単純におこなわれるのではなくて、アデニンへの分解とか、他への転用があるからであろう。

TPC阻害によるATPの減少とポンプ活性を対応させてみると(図4-4)、ATPの濃度が20%になるとポンプ活性がほとんどなくな

る。ポンプの活性の阻害を細胞内の ATP 濃度減少だけですべて説明するのはむずかしい。たとえば i) 0.5 mM 前後でポンプの反応機構が変化する、ii) 化学量論比が変わる、iii) アロステリック効果がある というようなことを考える必要がある。これは E_2 の変化の仕方とも大いに関係がある。(6-2章参照)

5 温度特性

5-1 静止電位と活動電位

シャジクモ節間細胞の静止膜電位は、室温から低温へ温度を下げると、脱分極する。この脱分極は 5°C まで可逆的でそれより低温にすると不可逆となる。この時、細胞の活性を表している原形質が停止していることが多い。節間細胞に対するこのような、温度特性が、受動成分の特性によるものか、起電性ポンプの特性によるものかを調べることにより、起電性イオンポンプの機構を考える材料とする。

実験は、 $5\sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲で行った。図5-1のRESTが静止電位の温度変化を示す。 5°C の方が 20°C よりも約 60mV 浅い。コンダクタンスは温度が下がるにつれて小さくなり、 5°C では 20°C の約半分の $50\mu\text{S}/\text{cm}^2$ となる(図5-2)。温度を下げると活動電位の時間経過が全体として遅くなる。又、コンダクタンスの変化も全

図 5-2 温度とコンダクタンス

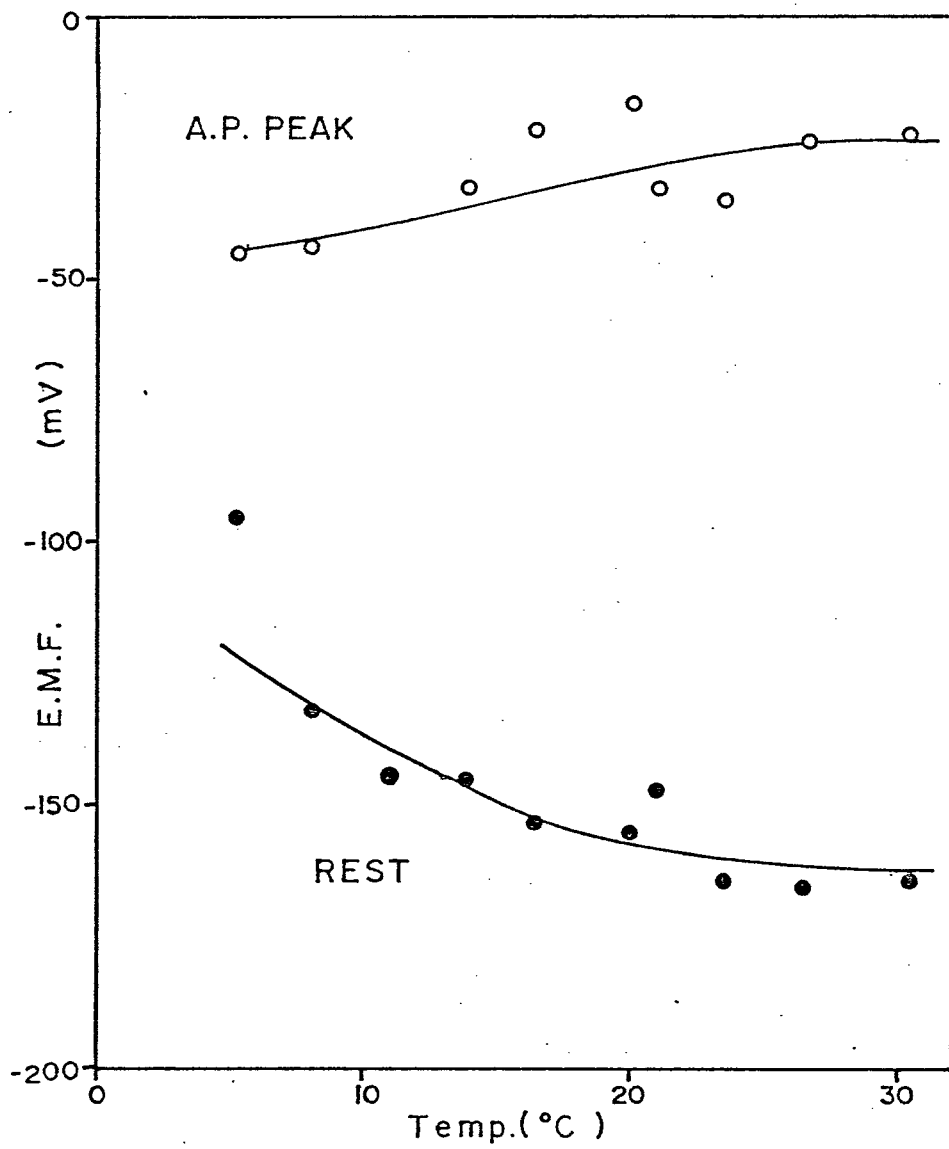
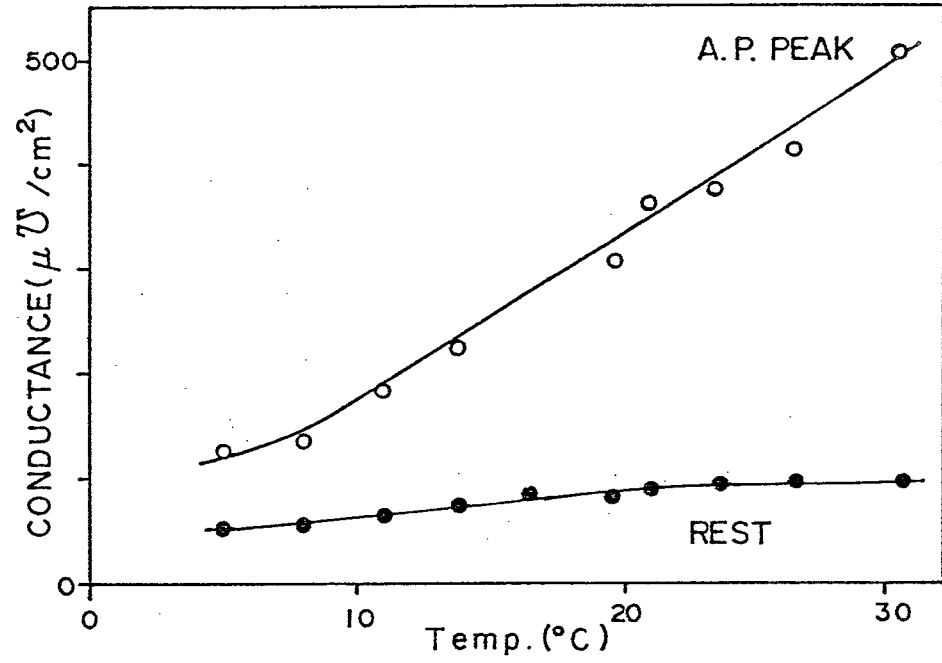


図 5-1 温度と膜起電力

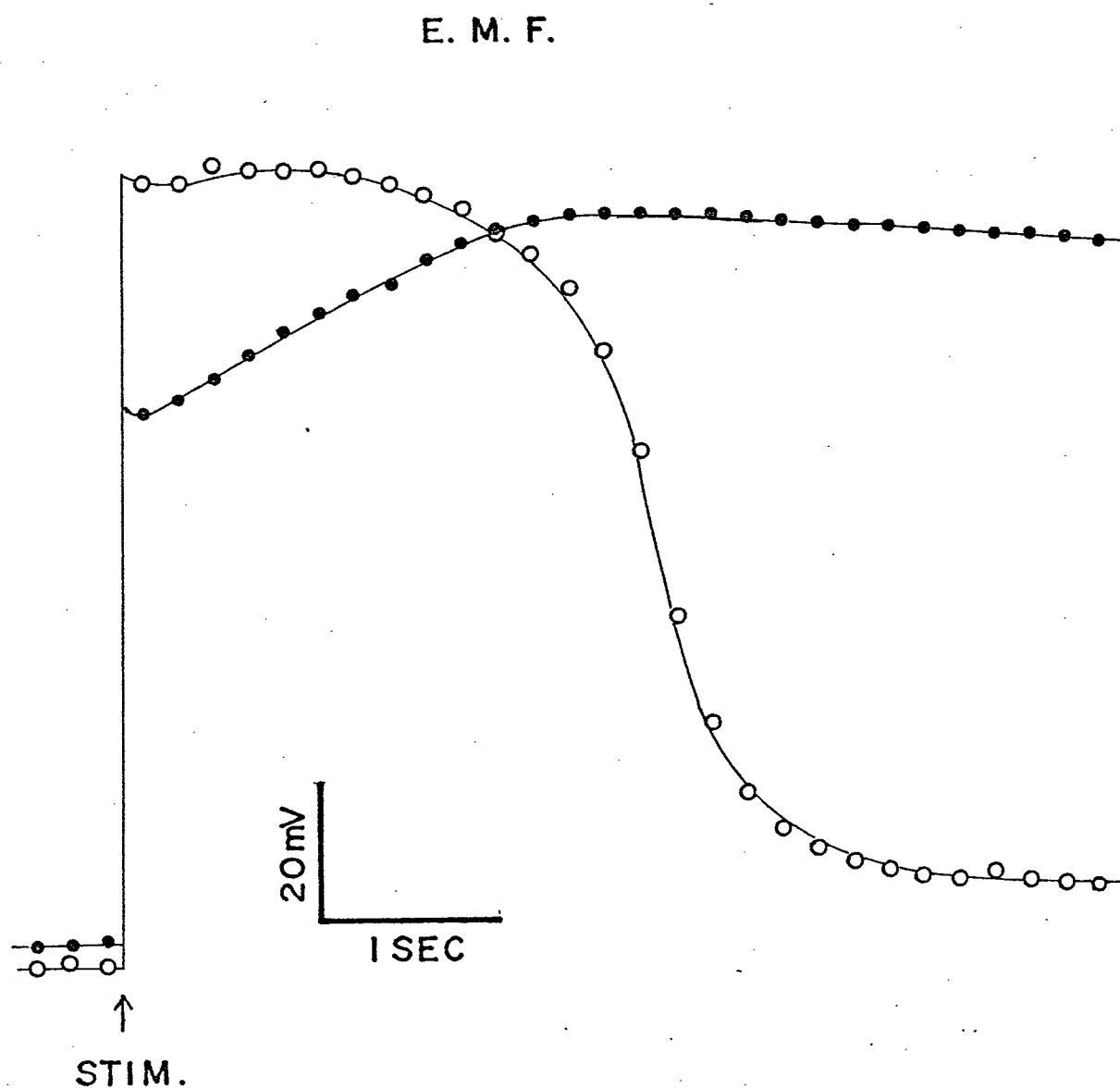
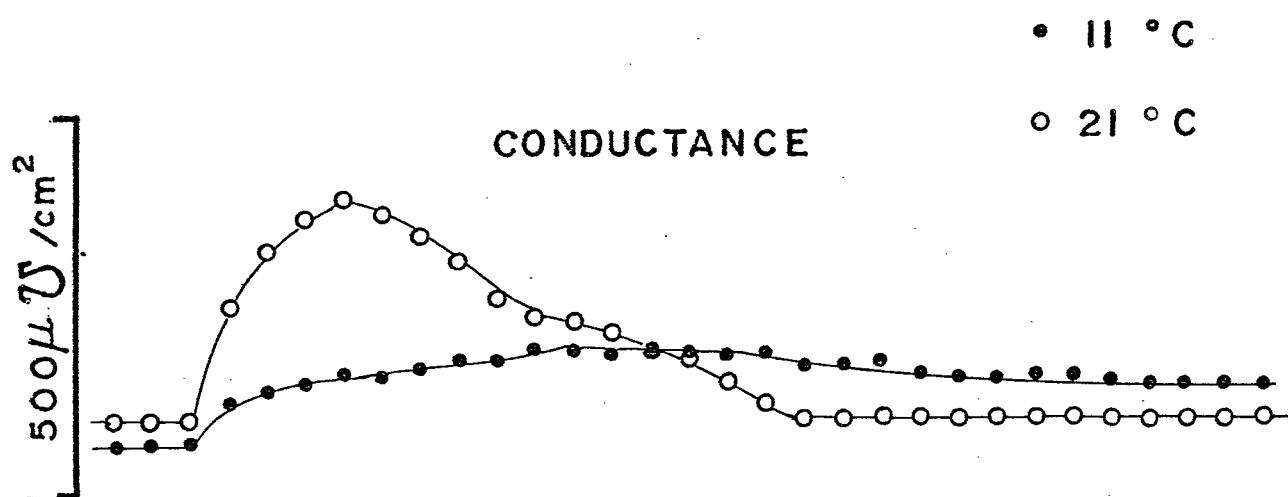


図 5-3 活動電位と温度

体の経過が遅くなり、変化量も小さくなる。

図5-3は 11°C と 21°C の活動電位を示している。コンダクタンスと電位のピークの時間的な差がそれぞれ明瞭にでている。活動電位ピーク時(A.P. PEAK)の膜電位は温度が下がるとわずかに過分極する。(図5-1)コンダクタンスは温度が下がると急激に減少する。 $Q_{10}=2$ である(図5-2)。

5-2 活動電位の持続時間

活動電位の Duration(持続時間)は、低温ほど長くなる。この時、電位のピークとコンダクタンスのピークがそれぞれ、刺激を加えた時間から遅れてくる(図5-3)。

活動電位の半値巾と刺激から電位ピークまでの時間を対応させてみると、温度特性がよく一致している(図5-4)。このことは、低温で Duration が長くなるという現象が、イオンチャンネルの活性化、不活性化が共に遅くなること

を示している。これは、イカ神経の伝導する活動電位の温度特性と非常によく似ている (Huxley (1959))。

5 - 3 温度と受動成分, 起電性成分

Saito and Senda (1973) は、ニテラの膜電位の pH 依存性が低温 (7°C) にすると非常に小さくなり、脱共役剤 DNP で阻害した時と同じになると報告している。又、Mummert ら (1981) は、カサノリの軸の膜の $I-V$ 特性が常温と低温で変化するのは、起電性ポンプ (Cl^- の取込み) が低温で阻害されるからである、と報告している。シャジクモの場合、温度を下げるとコンダクタンスが小さくなり、電位が脱分極する。これは、起電性イオンポンプが阻害されたと考えられる。

3 章で阻害剤を用いて求めた、起電性イオンポンプ成分と受動成分を使って温度特性について考察する。

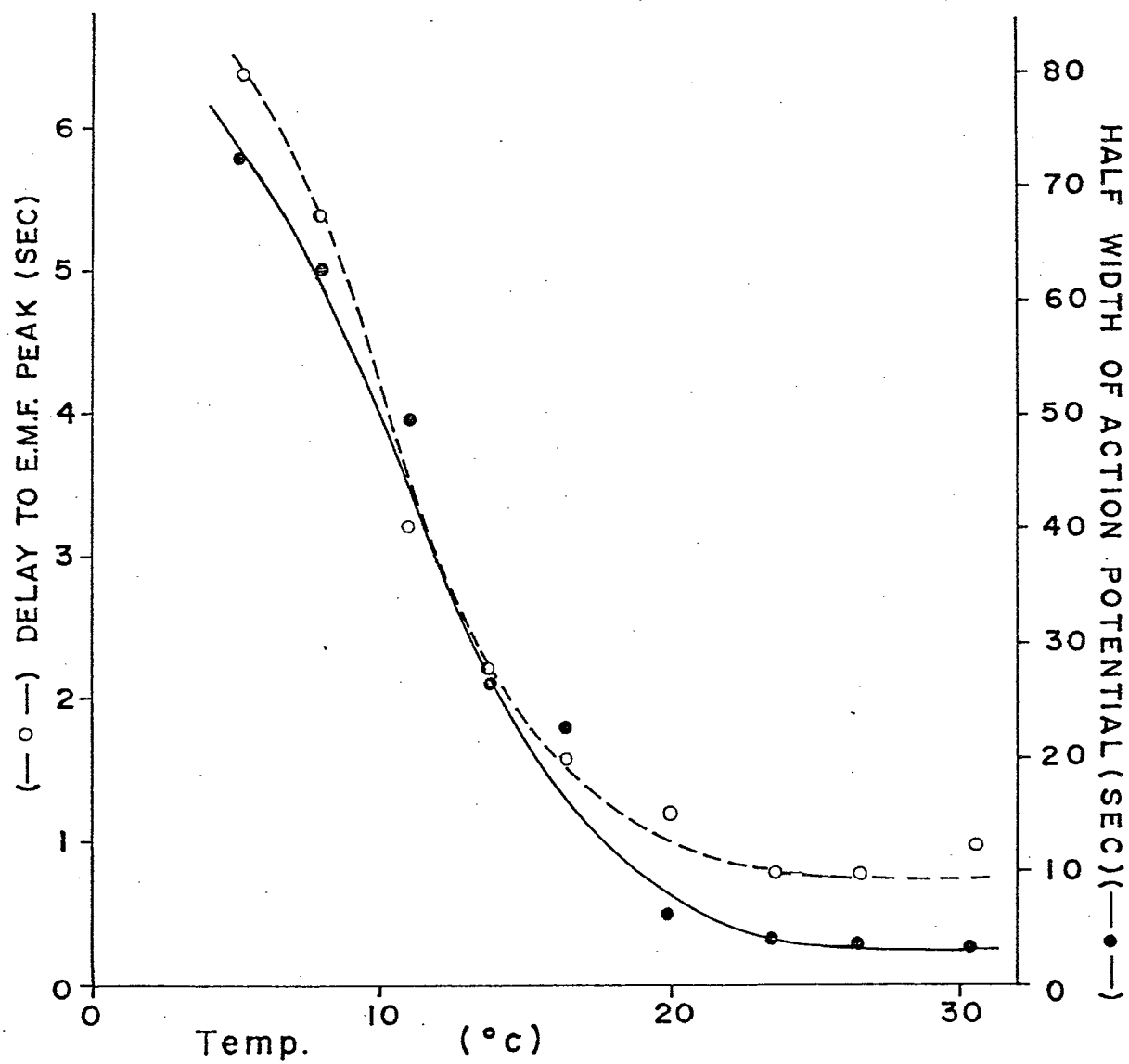


図 5-4 活動電位の中と電位ピークの温度変化

(REST)

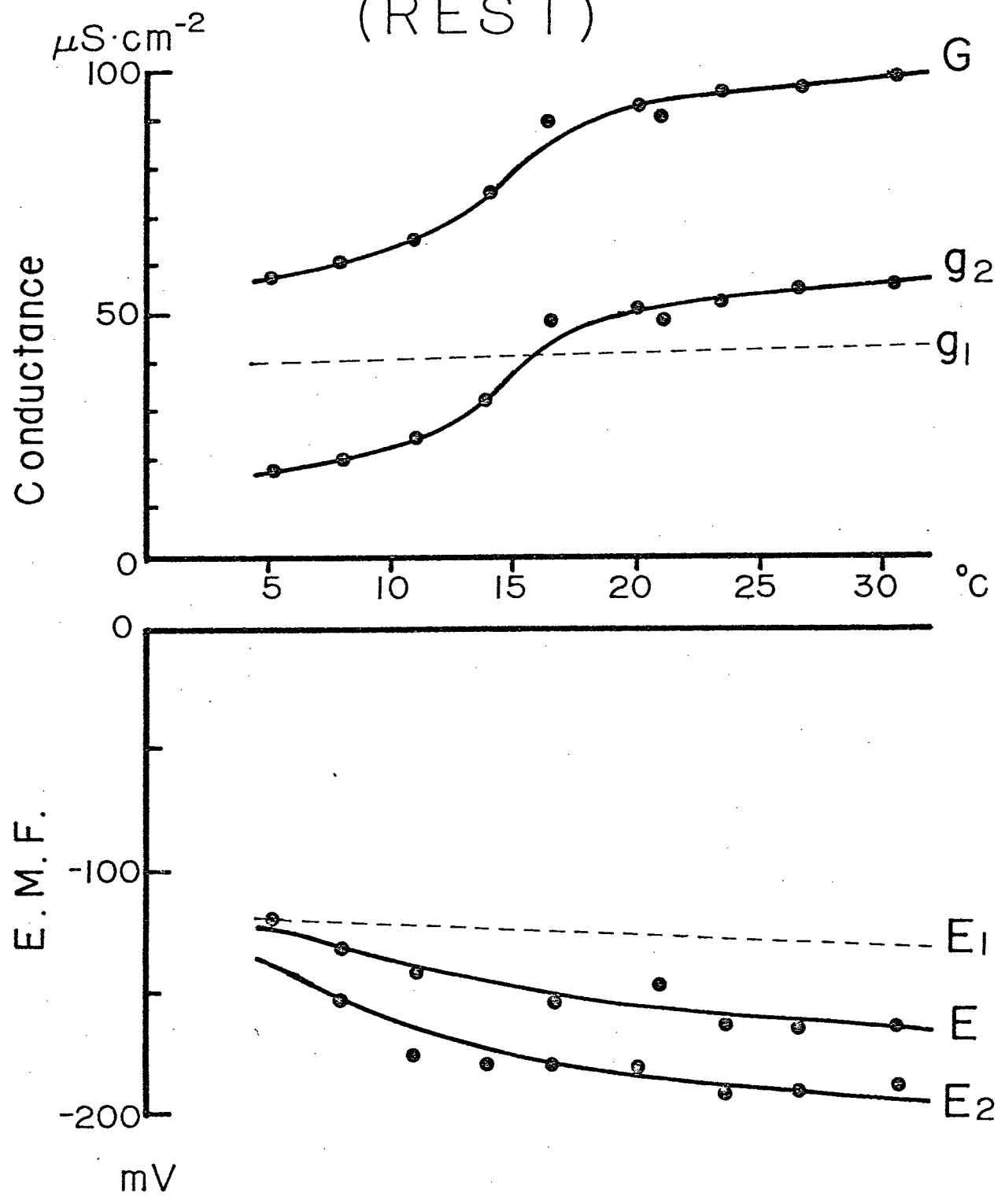
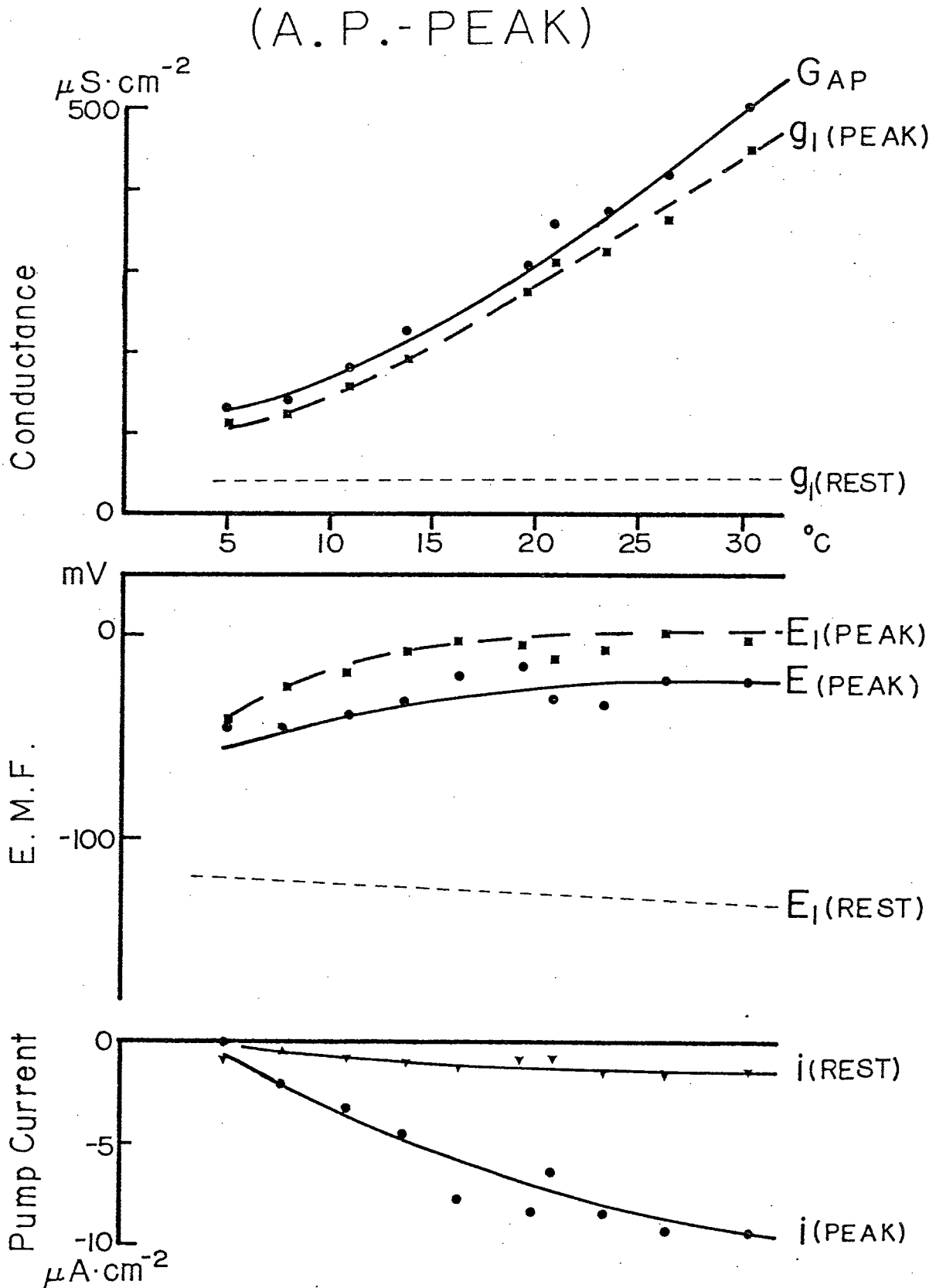


図 5-5 静止時の起電性成分と受動成分の温度特性

図 5-6 活動電位ピーク時の受動成分と
ポンプ電流の温度変化



一般に、酵素反応の温度係数は大きいが、Goldmanの膜理論で求められる電位やコンダクタンスの温度係数はそれと比べると、かなり小さい。つまり、温度を下げていくと、起電性ポンプの部分か、主に抑えられ、受動成分は、あまり変化しないことになる。そこで、図5-1, 2の静止時の起電力の変化とコンダクタンス変化を見てみると、起電力とコンダクタンスは漸近的に、それぞれ -120mV , $40\mu\text{S}/\text{cm}^2$ に近づいている。この値は、3章で求めた受動成分の値 -100mV , $60\mu\text{S}/\text{cm}^2$ にかなり近い。(材料が同じ細胞ではない) 0°C で完全にポンプ成分が阻害されるとして、 0°C の受動成分 E_1, g_1 をそれぞれ -120mV , $40\mu\text{S}/\text{cm}^2$ とし、温度係数を $1/273$ にして起電性成分 E_2, g_2 を計算すると、図5-5のようになる。静止時の E_2, g_2 の温度係数は、 E_1, g_1 よりも明らかに大きい。

静止時の E_2, g_2 を用いて、活動電位ピーク時の E_1, g_1 の温度変化を見ると(図5-6)、 E_1 は、低温にすると約 50mV 分極する。 g_1 は $Q_{10} \div 2$ 程

度の大きさが減少となっている。

以上のことから、温度を変えると大きさが変化をしているのは、起電性イオンポンプの g_2 と活動電位ピーク時の g_1 である。 g_2 は、ATP 加水分解によって生ずる自由エネルギー変化を使う酵素反応の結果なので、 $Q_{10} \div 2$ は妥当なところであろう。ピーク時の g_1 はチャンネルの活性化、不活性化の時定数が温度によって大きく変化することに対応していると考えられる。ここでは、 Cl^- チャンネルと K^+ チャンネルの 2 つが関与している。

5-4 膜コンダクタンスと活性化エネルギー

起電性ポンプ、受動チャンネルの機構を探るために、前節で求めた、コンダクタンスのアールニウスプロットから、それぞれの活性化エネルギーを計算した(図5-7)。図5-7を見ると、 g_2 が $20^\circ C$ 前後で折れ曲っている。活性化エネルギーは、 $20^\circ C$ 以上で 5.86 kJ/mole (1.39 kcal/mol)

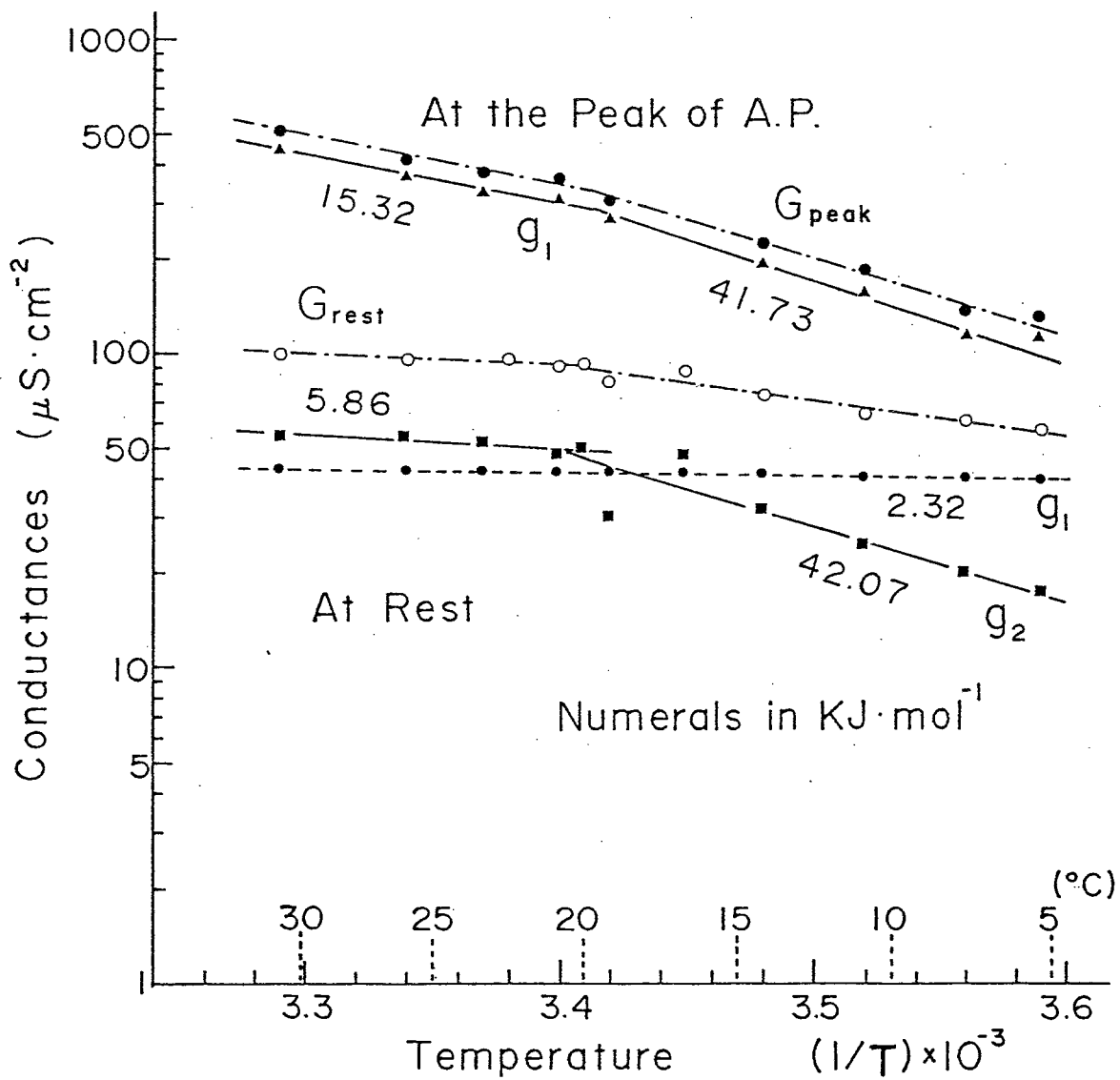


図5-7 静止時と活動電位ピーク時の
コンダクタンスのアルレニウスプロット。

20°C以下で 42.07 kJ/mole (10 kcal/mole)、であった。
これは、ポンプの機構が少なくとも2つの温度特性の異なる過程から出来ていることを示している。20°C以下の 10 kcal/mole は、ATP加水分解による自由エネルギー変化に近い値である。

活動電位ピーク時の g_i も又、20°Cで折れている。活性化エネルギーは、20°C以下で、 9.9 kcal/mole 、20°C以上で 3.65 kcal/mole であった。
これは、活動電位発生の機構も2つ以上の温度特性の異なる過程を含んでいることを示している。チャネルの開閉機構の問題とチャネルの数(種類)の問題とが、関係しているはずである。

6. 起電性イオンポンプの機構

3, 4, 5章で、シャジフモ節間細胞の静止電位、活動電位の形成に起電性ポンプが重要な働きをしていることを明らかにし、エネルギー源としてのATPの役割を示した。この章では、このことをふまえて、起電性イオンポンプがどのような機構でどのイオンを輸送しているのか調べ、ポンプ機構の反応モデルについても考察してみる。イオン種の問題については緒言で述べた様に H^+ であることがほぼ決まっているので、膜のpH依存性についてまず実験した。

6-1. pH特性

明条件でAPWのpHを変えてEとGをそれぞれのpHで測定したのち、暗+ $2\mu M$ TPCでポンプを阻害したのち同様のpH。変化に対してEとGを決める。この2つの実験で得られたデ

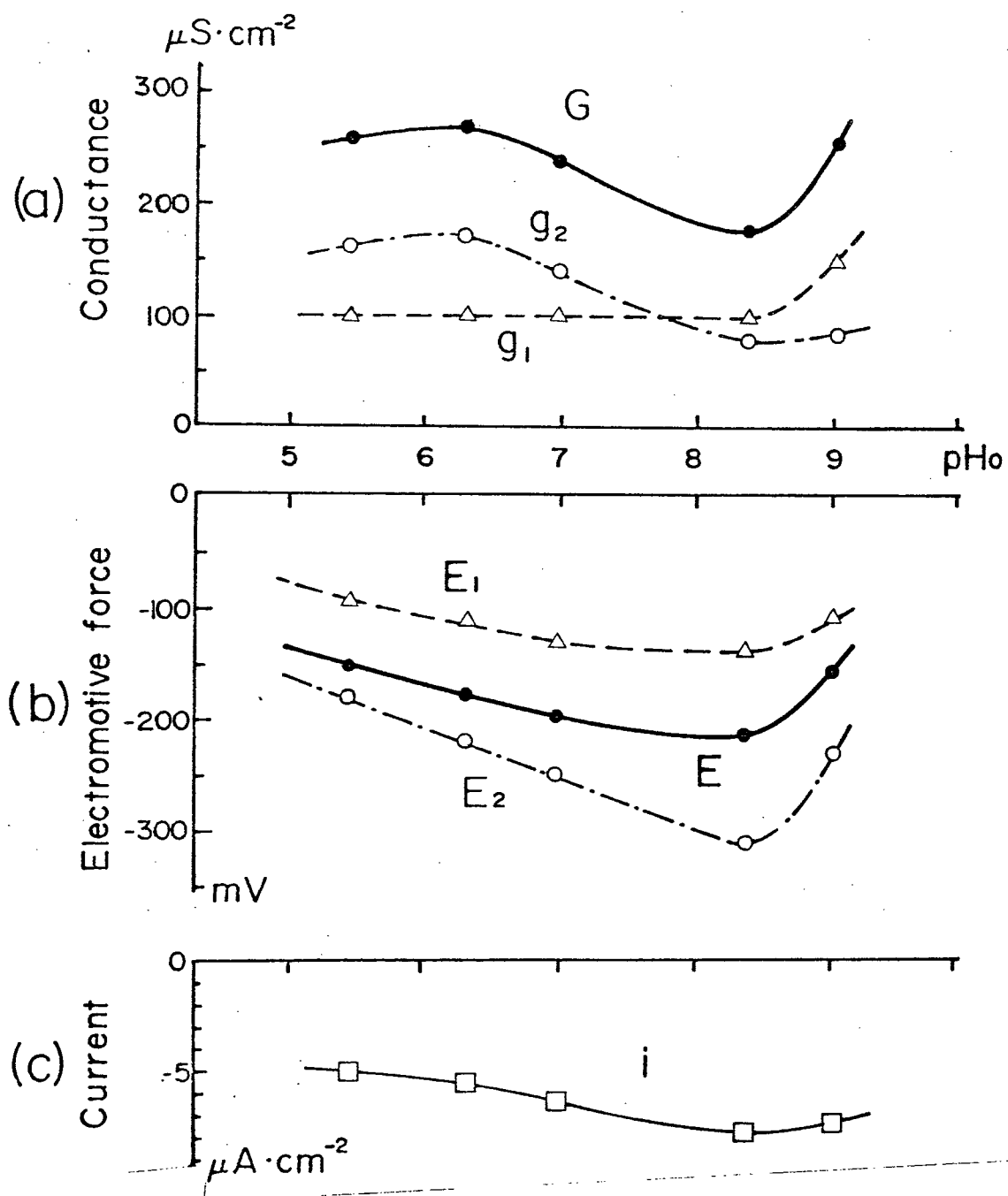


図 6-1 膜パラメータの pH_o 依存性

ー7から3章での方法に従って起電性成分 E_2 、 g_2 をそれぞれの pH で計算する。図 6-1 は、一個の細胞を使った一例である。E は pH₀ が大きくなるにしたがって過分極し pH₀ = 8.38 で極大となりそれ以上では脱分極する (-150 : pH 5.46 → -218 : pH 8.38 → -160 mV : pH 9.03)。G は pH₀ が大きくなるにしたがって小さくなり pH₀ = 8.38 で極小となり、再び増大する (255 → 176 → 230 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$)。E の pH 依存性を見ると pH₀ 5.46 ~ 8.38 では -34 mV/pH₀、pH₀ 8.38 ~ 9.03 では +89.23 mV/pH で酸性側では H⁺ 依存性が強くなっている。しかし pH₀ 8.38 以上では、スロープが大きすぎるので、なにか不可逆な変化がおこっていると解釈せざるを得ない。pH₀ > 9 に長くおくと、pH₀ 7 に戻したときに元の値には仲間もどろない事実もこれを支持している。これらの電位変化は、Kitasato (1968) らの実験データとよく一致している。

a) 受動成分の pH 特性

TPC 阻害後の電位とコンダクタンス即ち、 E_i , g_i は、元の E , G とくろべると pH 依存性が異なる。(図 6-1)。 E_i の pH 依存性は -23 mV/pH 、 g_i については、 $\text{pH}_0 = 5.46 \sim 8.38$ であまり変化していない。そこで、 g_i が H^+ , K^+ , Cl^- のチャンネルのコンダクタンス g_{H} , g_{K} , g_{Cl} だけでできていると考え、 g_{H} がゼロの状態からポンプ電流の 75% が H^+ チャンネルを流れるという状態まで考えて見た(図 6-2)。 g_{H} がゼロ、即ち受動性チャンネルに H^+ チャンネルがない時(g_{H} の大きいマーク)、 E_i の pH 依存性はもっぱら g_{K} , g_{Cl} の pH 依存性からきていることになる。一方、多少とも g_{H} の寄与がある時(g_{H} の小さいマーク)、やはり g_{K} と g_{Cl} の pH 依存性がのこったままで pH_0 が大きくなるにしたがって g_{H} が大きくなっている。これは、Goldman の膜理論から考えると不自然である。Goldman 式では $P_{\text{H}} \gg P_{\text{K}}$ で $P_{\text{H}}/P_{\text{K}}$ は 70 以上になる。(もっとも g_{H} の pH 依存性が逆で、ア

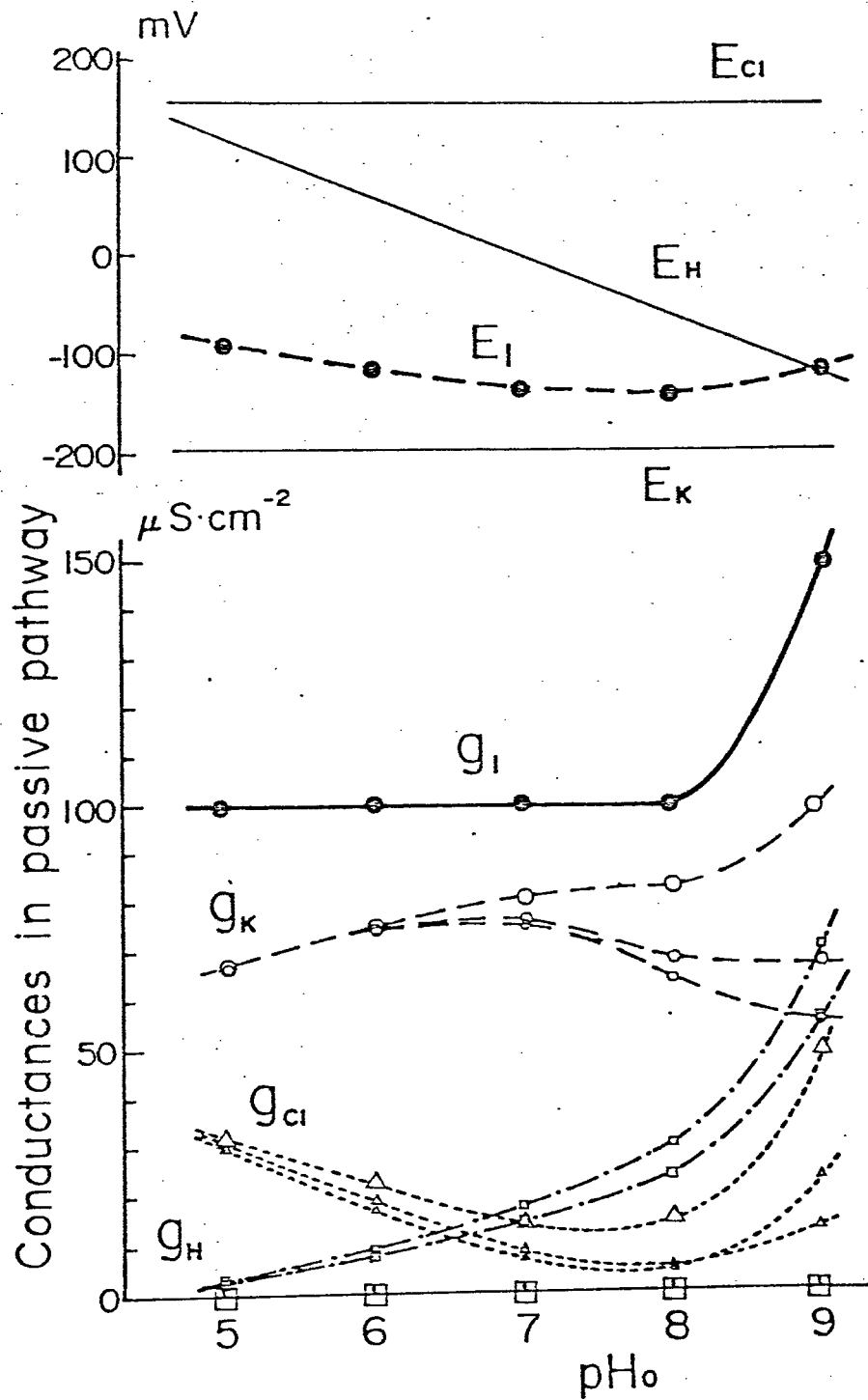


図 6-2 K^+ , Cl^- , H^+ チャンネルのコンダクタンスの
pH_o 依存性

ロステリッフ的なことがあるとすれば話は別だが)。受動成分に占める g_H の割合は殆んどないと考えた方が合理的と思われる。ミトコンドリアや細菌の膜は、一般に H^+ の受動的透過性が低く、ポンプや電子伝達系で作った H^+ の化学ポテンシャルを保持する役割をはたしている。 g_H が大きくないことは、それほどおかしくはない。 pH_0 8.38 以上での G の上昇は g_1 の増大を反映している。アニオン (OH^- か?) の透過性も増大しているのかもしれない。

6) 起電性イオンポンプの pH 依存性

G , E , g_1 , E_1 から g_2 , E_2 を計算した (図 6-1)。 E_2 の pH 依存性が E よりも一層大きくなり pH_0 5.46 ~ 8.38 では -49 mV/pH となる。また G の pH 依存性のほとんどが g_2 の pH 依存性の結果であることがわかる。ポンプ電流も pH_0 8.38 で最大となる。 E_2 の pH 依存性からみるとポンプが H^+ を起電的に排出する機構であることがわかる。ただ、 E_2 の値そのものから見ても、 E_1 を考える時とまったく別の考え

方をする必要がある。なぜなら、 E_2 は E_H よりも数100 mV 負側にあるからである。

次節で、この問題を明らかにするために、エネルギー論と、化学反応のモデルを使っての反応速度論的解釈の両面から考察してみる。

6-2 ポンプの機構とモデル

前節では、シャジクモの起電性ポンプが、 H^+ ポンプであることを示唆した。この節では、これまでのデータから、ポンプの機構を推定し、簡単な反応モデルを考えて、シミュレーションが、どの程度できるかを考察してみる。

ATP を加水分解して生じる自由エネルギー変化を利用して、膜の内側から外側に H^+ を排出する機構を、まずエネルギー論の立場から考える。 H^+ の起電的輸送にかかわる、てくるエネルギーには、以下の3つがある。

a) 1モルの ATP の加水分解で生ずる自由エネルギー変化 ΔG_{ATP} ;

$$\Delta G_{ATP} = \Delta G_{ATP}^{\circ} - RT \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]} \quad [1]$$

(ΔG_{ATP}° : Standard free energy change)

b) z 当量の H^+ を排出する浸透圧的の仕事のエネルギー $-\Delta G_{os}$;

$$\Delta G_{os} = zRT \ln \frac{[H^+]_{out}}{[H^+]_{in}} \quad [2]$$

c) 膜中の電場を通して、 z 当量の電荷を外に送り出すのに、必要な電気的工作のエネルギー $-\Delta G_{el}$;

$$\Delta G_{el} = zFV \quad (V; \text{膜電位}) \quad [3]$$

H^+ がポンプによって、起電的に輸送されるためには、自由エネルギー変化の合計 ΔG_{total} が、負にたらないといけない。式(1)-(3)より、

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{ATP} + \Delta G_{os} + \Delta G_{el} \leq 0 \quad [4]$$

$[ATP] = 1 \text{ mM}$, $[ATP] = 0.3 \text{ mM}$, $[P_i] = 0.5 \text{ mM}$, $\Delta G^{\circ}_{ATP} = -7.2 \text{ kcal}$, 細胞内外の pH 7, V を -20 mV とすると(4章, 図6-1, 及び, 香川(1978)より), 式[4]は,

$$\Delta G_{total} = -12.33 + 4.64 \cdot z \quad (\text{K cal}) \quad [5]$$

$\Delta G_{total} \leq 0$ を満たす z は、整数である限り、1

か、2しかない。Mitchellの化学浸透圧説では、 $z=2$ としている。又、Slaymanは、アカパンカビの場合では $z=2$ としている。シャジクモの場合では、1モルのATP加水分解によって、2モルの H^+ が排出されると期待される。

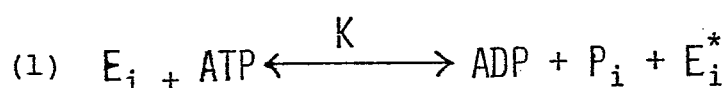
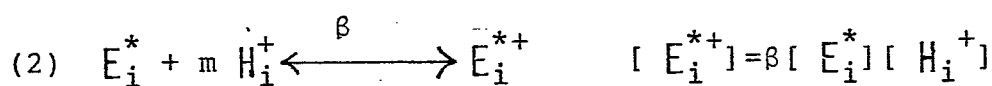
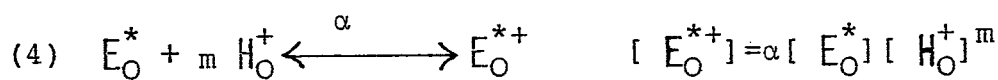
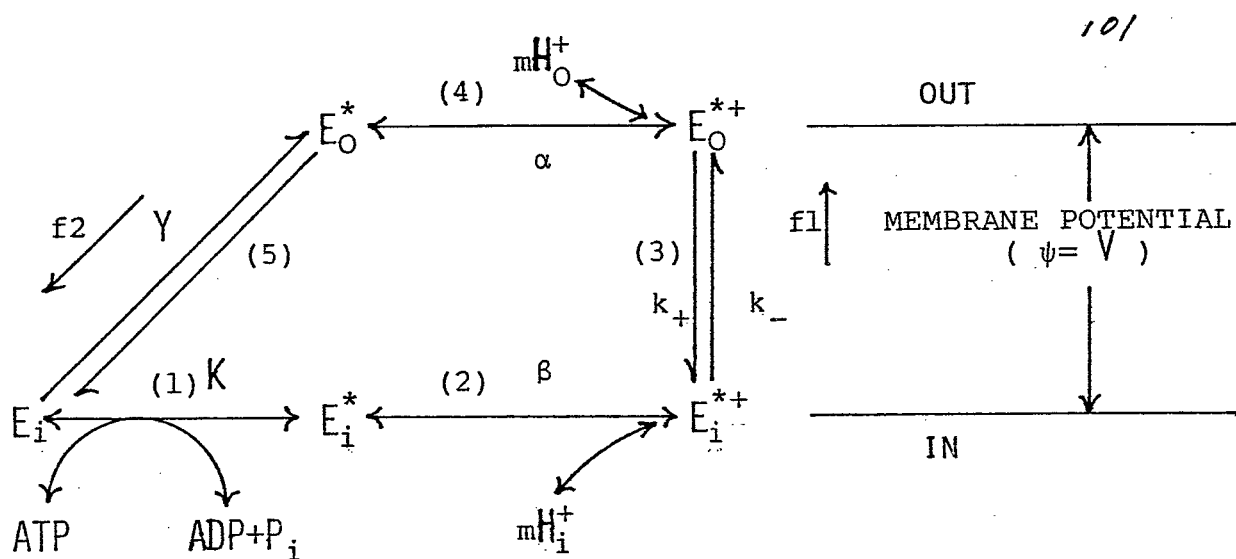
Rapoport (1970) は、非平衡熱力学の立場から、起電性ポンプ(Na^+, K^+ -ATPase)が、抵抗と起電力を直列に接続したものととして表現できると報告している(モデル計算)。この論文でも、起電性ポンプが定電流源ではなくて、内部抵抗を持った起電力として表現するのが、適当であることを3章で、明らかにした。そこで起電性イオンポンプの起電力 E_2 の値について考えてみよう。 ΔG_{ATP} が2モルの H^+ を輸送するために使われるとすると、1モル当り、 $\frac{\Delta G_{ATP}}{2}$ 使われる。このエネルギーが、全て、電位差のエネルギーに変換されたとすると、 -267.5 mVとなる。ポンプの部分の H^+ の駆動力は、これ以外に、 H^+ の化学ポテンシャル(電気化学ポテンシャルではない)の差による、自由エネルギー

一を、加えたものとする。故に、ポンプの起電力の最大値 $E_{p\max}$ は、

$$E_{p\max} = -267.5 + 58.16 \cdot \Delta pH \quad (\text{mV}) \quad [6]$$

$$(\Delta pH = pH_{\text{in}} - pH_{\text{out}})$$

としたり、 $pH_0 = 7$ とすると、 $E_{p\max} = -267.5 \text{ mV}$ 。
 この値は、図6-1の $pH_0 = 7$ の E_2 の値 -253.6 mV に非常に近く、しかも、それより深い電位である。実際のポンプは、 V という電場がかかっている (-200 mV)。ポンプが発揮できる排出力は、 $-267.5 - (-200) = -67.5 \text{ mV}$ である。この時のポンプのコンダクタンスは、たとえば図6-1では、 $135 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ ですので、ポンプ電流の最大値は、 $-67.5 \text{ mV} \times 135 \mu\text{S}/\text{cm}^2 = -9.05 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ としたり、図6-1の $-7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と比べると、かなり良い値であると言える。式[6]より、 $E_{p\max}$ の pH 依存性は、スロープ $-58.16 \text{ mV}/pH$ としたり。実際の E_2 の pH 依存性が強いことと、 E_2 がエネルギー論の立場からの最大値 $E_{p\max}$ に近いこと、この2点は、ポンプの起電力 E_2 の成因から、定性的には十分に説明できていると考えられる。しかし、 E_2



$$[E_i] = M [E_i^*]$$

$$M = \frac{[ADP][P_i]}{K [ATP]}$$

図 6-3 起電性イオンポンプの反応モデル

のPHによる変化が、 $58\text{mV}/\text{pH}$ よりも小さいこと、 g_2 のPH依存性、 E_2 と $E_{p\max}$ の差などを説明するのは簡単ではない。そこで、ポンプの反応モデルを想定し、これらの事実を説明できるかどうか、考察する。

起電性イオンポンプのモデルが、持っているべき反応は、(1) ATP加水分解、(2)活性化酵素への H^+ の結合、(3) H^+ -酵素複合体(状態)の膜内への移動、(4) 酵素からの H^+ の遊離、(5) 酵素の初期状態への復帰、の5反応である。これらの反応を全て含んでいる、もっとも簡単なモデルを考えてみた(図6-3)。

酵素が E_0^* , E_0^{*+} , E_i^{*+} , E_i^* , E_i の5つの状態を取る。 E_i は ATP 加水分解と共役して、活性化状態 E_i^* となる。 E_i^* は m 個の H^+ を結合して、 m 個の電荷を持った E_i^{*+} となる。 E_i^{*+} は、電位差 V の電場の中を通って、膜の外側に移動して、 E_0^{*+} となる。 E_0^{*+} は、外側で m 個の H^+ をはたして E_0^* となる。 E_0^* は、膜内を無電荷で移動して、 E_i となる。 解析を簡単にするために、反応(1)

(2)(4)は、準平衡状態にたっている、反応のゆききが(3)(5)よりも、圧倒的に速く、反応(3)は、膜電位 V に依存した反応速度 k_+ , k_- を持つ。

反応(5)は、内向きと外向きで反応速度が同じであるとする。反応のすみ方としては、 E_i^* と E_o^* は、同じエネルギー準位にあり、反応(1),(5)がたっている時には、 V の値、 H_{in}^+ , H_{out}^+ の濃度によって、(2),(3),(4)は、どちらに進む。反応(1)が、 E_i^* の量を増大させることによって、全体を、反時計回りに進めると仮定する。

以上の仮定から、式を導びく。

E_o^{*+} と E_i^{*+} のエネルギー差 ΔU は、反応(2)(4)の反応によるエネルギー差と、電場のエネルギーの差で表現できる。

$$\Delta U = U_o - U_i - mFV$$

[7]

$$(U_o = -RT \ln \alpha, U_i = -RT \ln \beta)$$

F はファラデー定数、 R は気体定数、 T は絶対温度である。 ΔU が、外向きと、内向きで2分されるとすると、 k_+ , k_- は、以下の様に表現できる。

$$k_- = k e^{\frac{U_0 - U_i - mFV}{2RT}} \quad [8]$$

$$k_+ = k e^{\frac{U_0 - U_i - mFV}{2RT}} \quad [9]$$

式 [8], [9] より

$$\alpha k_+ = k(\alpha\beta)^{\frac{1}{2}} e^{\frac{mFV}{2RT}} \quad [10]$$

$$\beta k_- = k(\alpha\beta)^{\frac{1}{2}} e^{\frac{mFV}{2RT}} \quad [11]$$

となる。一方反応 (1) (2) (4) は、以下の様になり、

$$[E_O^{*+}] = \alpha [H_O^+] [E_O^*] \quad [12]$$

$$[E_i^{*+}] = \beta [H_i^+] [E_i^*] \quad [13]$$

$$[E_i] = M [E_i^*] \quad [14]$$

$$M = [ADP] [P_i] / [ATP] \quad [15]$$

E_i^{*+} が E_O^{*+} になる正味の量は、

$$f1 = k_- [E_i^{*+}] - k_+ [E_O^{*+}]$$

[10] ~ [14] 式により、これは、[16] 式で示され、

$$f1 = k(\alpha\beta)^{\frac{1}{2}} ([E_i^*] [H_i^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}} - [E_O^*] [H_O^+] e^{\frac{mFV}{2RT}}) \quad [16]$$

E_O^* が E_i になる正味の量は、

$$f2 = Y([E_O^*] - [E_i]) \quad [17]$$

となる。定常状態では、 $f1 = f2$ である、と仮

定すると、[14], [15]式から、 E_i^* と E_o^* の比 N が求められる。

$$N = \frac{[E_i^*]}{[E_o^*]} = \frac{A[H_o^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}} + 1}{A[H_i^+] e^{\frac{mFV}{2RT}} + M} \quad [18]$$

($A = k(\alpha\beta)^{\frac{1}{2}} / Y$)

又、[12]~[14]式より、酵素の状態合計(量)中の E_o^* の分配を計算すると、

$$[E_o^*] = \frac{[E]}{(1 + \alpha[H_o^+]^m) + N(1 + M + \beta[H_i^+]^m)} \quad [19]$$

($\because [E] = [E_o^{*+}] + [E_o^*] + [E_i] + [E_i^*] + [E_i^{*+}]$)

[17]~[19]式より、 t_2 を求めると、

$$f_2 = k(\alpha\beta)^{\frac{1}{2}} [E] \frac{([H_i^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}} - M[H_o^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}})}{(1 + \alpha[H_i^+]^m)(A[H_o^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}} + M) + (1 + M + \beta[H_i^+]^m)(A[H_o^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}} + 1)} \quad [20]$$

となる。 $t_2 = 0$ となる V があれば、それが、このポンプの起電力と膜電位が、つりあったところ、即ち、ポンプの起電力 E_p となる。

[20]式より、

$$[H_i^+]^m e^{\frac{mFE_p}{2RT}} = M[H_o^+]^m e^{\frac{mFE_p}{2RT}}$$

$$E_p = \frac{1}{m} \frac{RT}{F} \ln M + \frac{RT}{F} \ln \frac{[H_i^+]}{[H_o^+]} \quad [21]$$

$$K = K' / K_{ATP}$$

(K_{ATP} : ATP加水分解反応の平衡定数)

とすると、[21]式の第一項は、[15]式から、

$$\frac{1}{m} \left\{ \frac{RT}{F} (\ln K_{ATP} - \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}) - \frac{RT}{F} \ln K' \right\}$$

となる。そこで、

$$E_p = \frac{RT}{F} (\ln K_{ATP} - \ln \frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}) \quad [22]$$

$$E_H = \frac{RT}{F} \ln \frac{[H_i^+]}{[H_o^+]} \quad [23]$$

$$E_R = \frac{1}{m} \frac{RT}{F} \ln K' \quad [24]$$

とおくと、[21]式は、

$$E_p = \frac{1}{m} E_{ATP} - E_H + E_R \quad [25]$$

と表現できる。 E_{ATP} は、ATP加水分解で生ずる自由エネルギー変化 ΔG_{ATP} をファラデー定数で割ったものに他ならない。 E_H は、 H^+ の平衡電位である。 E_R は、ATPによる駆動力が、 m 個の H^+ 輸送に、均等に使われ、

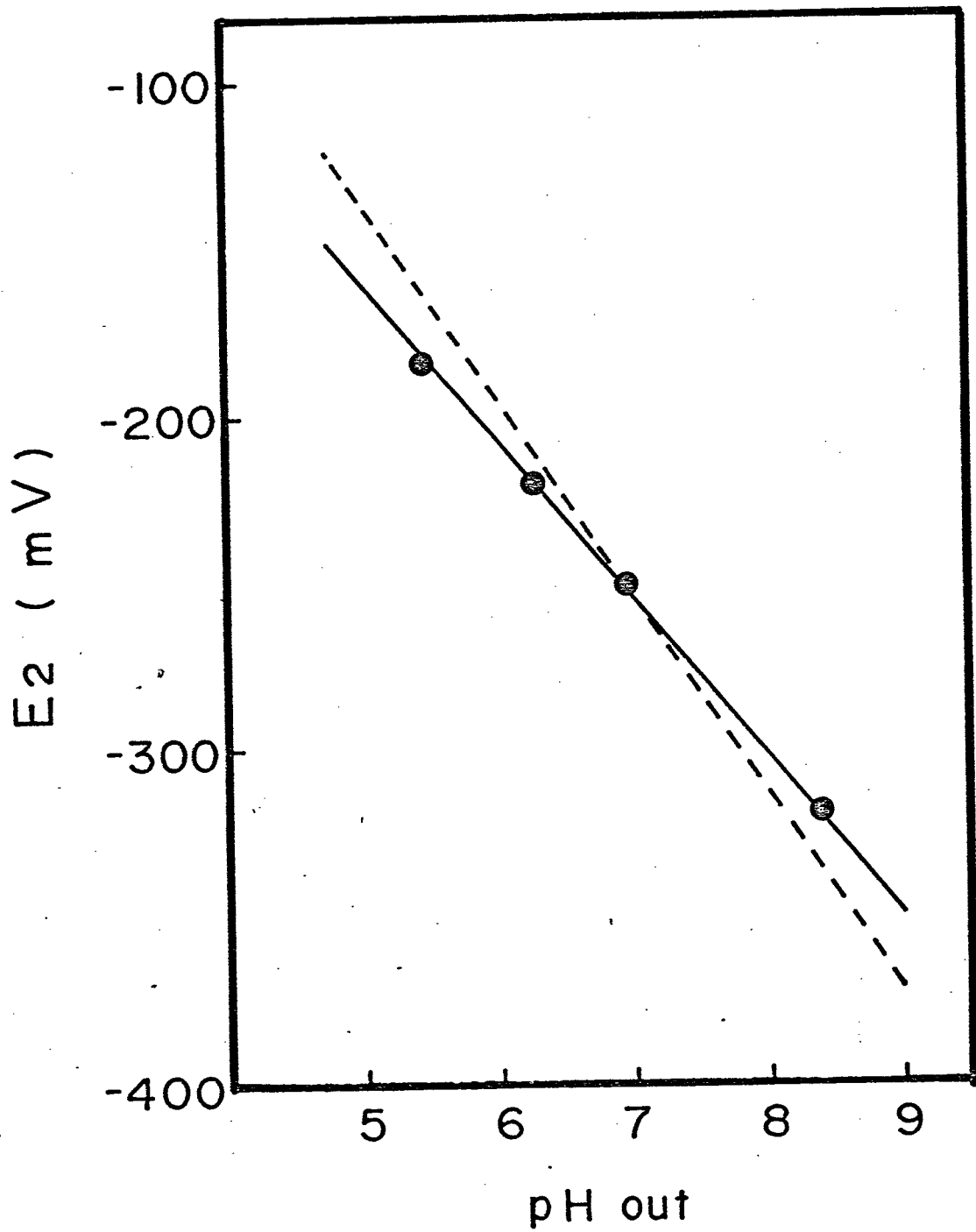


図 6-4 E_2 の pH_o 依存性

(● : データ , --- : H^+ ポンプだけのモデル)
(— : Cl^- ポンプもある場合の計算値)

その駆動力から、 H^+ の濃度勾配の力と、反応定数の力を差し引いたものとなっている。

この式の形は、前のエネルギー論での、ポンプの最大起電力の式と、ほとんど同じである。

E_p のpH依存性もまた、平衡電位のスロープ (-58 mV/pH) である (20°C)。図 6-1 から、 $\text{pH}_0 =$

6.96 の時の、 $E_2 = -253.6 \text{ mV}$, $m=2$ で計算すると、

$E_R = 13.9 \text{ mV}$ となる。他の pH についても、同様に求めてみると、図 6-4 の破線の様になる。

データとの差は、データのスロープが異なっ

ていることによる。測定データの E_2 のスロー

プは、 -49 mV/pH である。又、 E_R が正というこ

とは、ATP のエネルギーが (2) ~ (4) の反応 (H^+ を

輸送するのに直接関係した反応) に 100% 投

入されているのではなくて、 E_i が E_i^* になる反

応(i)で、消費される分が E_R に相等することと

示している。

ポンプ電流 I_p は、 t_i に E_0^{*+} や E_i^{*+} の荷電数 m とファラデー定数を乗じたものとして、表現される。

$$I_p = mFfI$$

[26]

[20]式を、簡略化して、 I_p を表現すると、

$$I_p \propto \frac{e^{\frac{mFV}{2RT}} (1 - e^{\frac{mF(E_p - V)}{RT}})}{e^{\frac{mFV}{2RT} + K_1} e^{\frac{mFV}{2RT} + K_2}} \quad [27]$$

(K_1, K_2 は定数)

となる。そこで、 $E_p = -253.6 \text{ mV}$ (pH 6.96, 図6-1, E_2 より) として K_1, K_2 に適当な値を入れて、 I_p - V 特性を計算した一例が図6-5である。I-V特性から、弦コンダクタンスを求めてみると、0mVあたりで $1/2$ になる程度で、あまり大きく変化していない。このことは、活動電位発生中でも、ポンプのコンダクタンス g_2 が、変化しないという仮定から、かけはつれていいと考えられる。このモデルでは、ポンプは内部抵抗を持った起電力として表現できている。すくなくとも、この例では、 E_p と 0mV の間で定電流源として働く場合がいい。I-V特性は、Hansenら(1981)の kinetics と基本的に、よく似たものであった。又、Gradmann(1975)、Gradmannら(1978)の、カサノリやアカパンカ

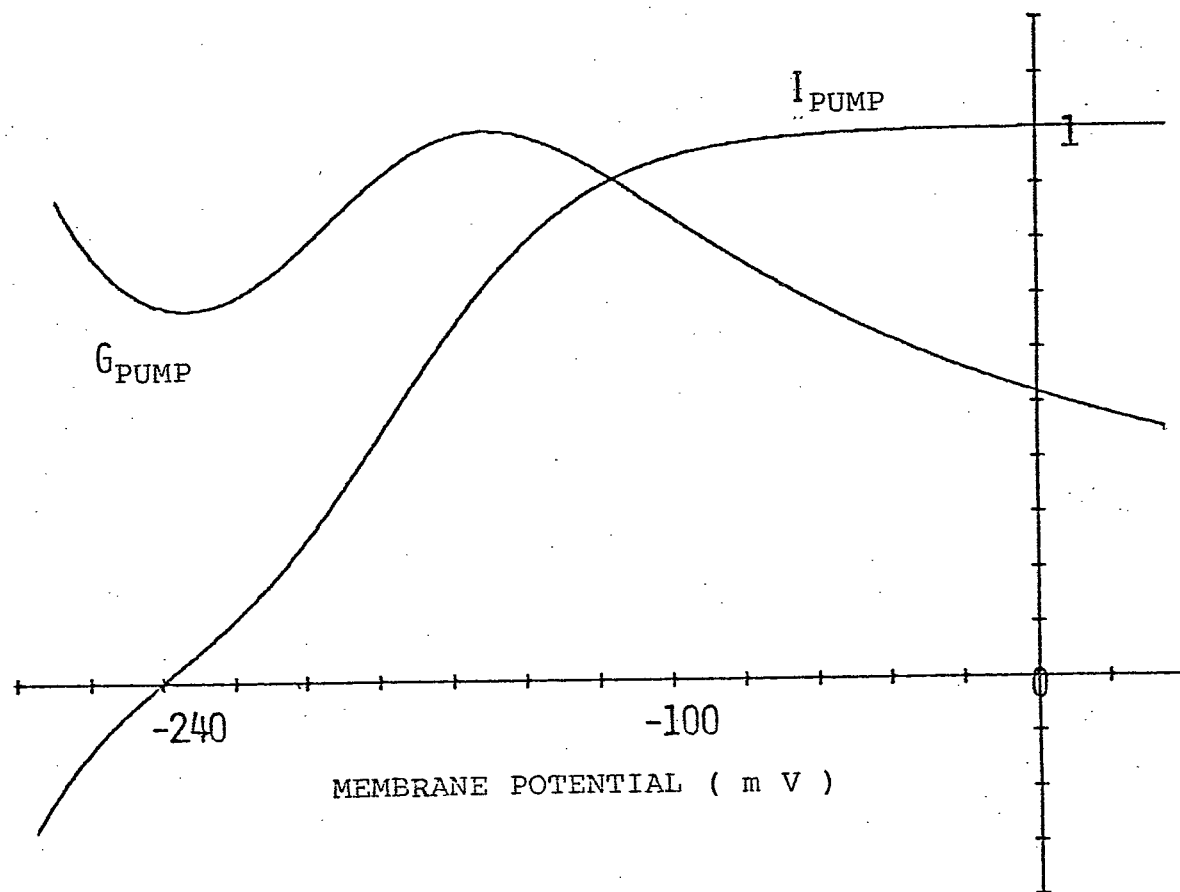


図 6-5 H^+ ポンプの反応モデルの解の一例.

$$\left(K_1 = 10^{-10}, K_2 = 10^{-3} \right)$$

G_{pump} はコードコンダクタンス

びなどの、 $I-V$ 特性(ポンプの)とも似ている。

TPC 阻害の過程(図3-4)で、ポンプの起電力 E_2 が、過分極したのち、又、脱分極する現象は、TPC が、どのような機構で、ポンプを阻害しているのかを、考える上で重要な知見である。TPC によって、細胞内 ATP 濃度が、減少することは、4章で示したが、TPC 阻害で、 $[ATP]=0.3mM$, $[ADP]=[P_i]=0.5mM$ になるとすると、[25]式の E_{ATP} が $-267mV$ から $-245mV$ に脱分極する。つまり、 E_2 を過分極に引っぱるためには、1分子の ATP が、2個より少ない H^+ を輸送できなくなると考えればよい。すなわち、 $m < 2$ 。最大の過分極時に、 $E_2 = -450mV$ 、程度となるので、ほとんど $m = (ATP/H^+) = 1$ となっていると思われる。この時点では、ポンプがかたまり阻害されて、 g_2 が小さくなり、 E_2 の分極した分の効果は、あまりポンプ電流に反映されていない。60分の時点で、ポンプは完全に阻害されている。ATP 濃度は $1/3$ にならなっているため、阻害を、ATP 濃度減少

だけで説明するのはむづかしい。TPCがポンプに直接作用していると思われる。

反応モデルで、 E_2 のpH依存性が、完全にシミュレートできない理由として、3つの可能性がある。

1) 細胞内のpHが外のpHを下げると下がる。

2) TPC阻害で求めた、 E_1, g_1 のpH依存性が、何らかの問題を含んでいる。

3) もっと駆動力の大きい、別の駆電性イオンポンプがある。

以上の3つである。

1) については、Walker and Smith (1975) が、DMOを用いて、原形質のpHを測定している。彼らによると、APWのpHを下げて、内側のpHはあまり変化しない。しかし、膜のすぐ内側への H^+ の蓄積という、局所的なpHの減少で、膜に直接作用している ΔpH が、bulkの ΔpH の約84% ($= 49/58$) になっている可能性がある。

2) は、1)とも関係があるが、 g_1, g_2 の電位依存性の問題や、後述する共輸送 (co-transport)

の成分が、 E_i, g_i に含まれる可能性がある。

3)は、たとえば、ATP 1モルの加水分解で、1モルのイオンを輸送する別の起電性イオンポンプ^oを考えると説明できる。

H^+ ポンプ^oの反応モデルと、同じ形式のモデルを考えると、 i 種のイオンの起電性ポンプ^oの起電力 E_{pi} は、

$$E_{pi} = E_{ATP} + E_i + E_{Ri} \quad [28]$$

となる。ただし、 E_i は i 種イオンの平衡電位、 E_{Ri} は、反応定数の項である。2つのポンプ^oが並列に並らんでいて、2種のポンプ^oのコンダクタンスを g_{pH}, g_{pi} とすると、

$$g_2 = g_{pH} + g_{pi} \quad [29]$$

$$E_2 = (g_{pH} \cdot E_{pH} + g_{pi} \cdot E_{pi}) / g_2 \quad [30]$$

[30]式から、 E_2 のpH依存性は、 $\frac{g_{pH}}{g_2} E_{pH}$ で決まる。

図6-4のデータのスロー^oは -49 mV/pH だから、

$$-49 (\text{mV/pH}) = \frac{g_{pH}}{g_2} (-58 (\text{mV/pH}))$$

$g_{\text{pH}}/g_2 = 0.84$ となる。ポンプのコンダクタンスの 16% は、二番目のポンプ成分 g_{pi} となる。
 内外のイオン環境から考えて、二番目のポンプのイオン種は、 Cl^- と思われる。1 種を Cl^- にして、 E_{pi} を求めてみると、 $E_{\text{pH}} = -382 \text{ mV}$, $E_{\text{Cl}} = 40.7 \text{ mV}$ となる。この値で、 E_2 の pH 依存性に合せてみると、非常によく一致する(図 6-4 の実線)。
 シヤジクモでは、 Cl^- が能動的に、細胞内に輸送されているという報告がある(Beilby ら(1981), Sanders ら(1981))。ただ Sanders らによると、 Cl^- の輸送は H^+ の流入と共に役している共輸送で、2 分子の H^+ と 1 分子の Cl^- が同時に細胞内へはこばれる。すなわち、 H^+ の電気化学ポテンシャル差を使って、 Cl^- を内へ輸送する。この共輸送が電気生理的にどのように記述されるかが問題となる。そこで、図 6-3 の H^+ ポンプモデルと同様の考え方で、共輸送の起電力を計算すると、[31] 式の様になる。

$$E_{\text{co}} = \frac{2RT}{F} \ln \frac{[\text{H}_i^+]}{[\text{H}_o^+]} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Cl}_o^-]}{[\text{Cl}_i^-]} + E_x \quad [31]$$

(E_x : 反応定数の項)

[31]式で興味深いのは、 Cl^- が一見カチオンのように働くことと、 H^+ の寄与が2倍となっていることである。これは確かに E_2 の pH 依存性を変える因子となりうるが、ATP 濃度と、直接関係ないシステムなので、 E_2, g_2 の成分の中に組み込もうとすると、 H^+ ポンプと相互作用のあるような配置を考える必要がある。この点については、まだ想像の域を出ない。pH 特性を説明するためには、可能性 1) と 2) が無いと考えると、 H^+ ポンプ以外に、別のポンプ (Cl^- かどうかわからないが) が存在すると考えた方が論理的にはわかりやすい。しかし、この点を明らかにするためには、pH の正確な測定や、内部灌流実験で検証する必要がある。其輸送は、むしろ、 E_2 の pH 依存性に関与している、と考えられる。 g_2 の pH 依存性に関しては、電圧固定法を用いて、ポンプの $I-V$ 特性を測定し、モデルのパラメータをシミュレートによって決めたので、 g_2 の pH 特性がシミュレート出来るかどうか、検討する必要がある。定性的な評価と

して、適当な定数を入れて、[20]式を計算すると、 pH_0 が小さい方が、 g_2 が大きくなる傾向がある。このように、 H^+ の起電性イオンポンプの反応モデルを考えることにより、実験データ、特に pH 依存性を、よく説明できることがわかった。最近この反応モデルの方法によって、カサノリやアカパンカビで起電性ポンプの機構を研究する方法が、あらわれてきている(Mummertら(1981), Hansenら(1981))。

6-3 結び

起電性イオンポンプを電気生理学的手法を使って解析する方法は、非常に有効である。ポンプは本来、膜に組み込まれていて、膜電位という電場の影響を受けている。ポンプ活性と膜電位の関係が、直接、電流-電圧の関係で結びつけられる点で、生化学的手法では、できないような解析が可能となる。この方法

を、植物だけでなく、生化学的に多くのデータが得られている動物細胞の Na^+, K^+ -ATPase、 $\text{Ca}^{++}, \text{Mg}^{++}$ -ATPase などについて、適用すれば、すでに得られている反応の、速度論的解析の結果を、直接電流を測定することによって検証できるだろう。又、化学浸透説での、ATP合成系と、膜電位、化学ポテンシャルの関係を解析する上で、極めて重要な手法ではないだろうか。

1. Beilby, M.J. and N.A.Walker(1981) Chloride transport in Chara
I.Kinetics and current-voltage curves for a probable proton
symport, J.Expl.Bot. 32 43-54
2. Binstock, L., W.J. Adelman, Jr., J.P. Senft and H. Lecar (1975)
Determination of the resistance in series with the membranes
of giant axons, J.Membrane Biol. 21 25-47
3. Cole, K.S. and U. Kishimoto (1962) Platinized silver chloride
electrode, Science 136 381
4. Cole, K.S. (1968) Membranes, Ions and Impulses, II and III,
University California Press. Berkeley-Los angeles
5. Findlay, G.P. and A.B. Hope (1974) Ionic relations of cells of
Chara australis VII. The separate electrical characteristics
of the plasmalemma and tonoplast, Aust.J.Biol.Sci. 17 62-77
6. Gould, J.M. (1976) Inhibition by triphenyltin chloride of a tightly
bound membrane component involved in photophosphorylation,
J.Biochem. 62 567
7. Gradmann, D. (1975) Analog circuit of the Acetabularia membrane
J.Membrane Biol. 25 183-208
8. Gradmann, D., U.-P. Hansen, W.S. Long, C.L. Slayman and J. Warncke (1978)
Current-voltage relationships for the plasma membrane and its
principal electrogenic pump in Neurospora crassa: I. Steady-
state conditions, J.Membrane Biol. 39 333-367
9. Hansen, U.-P., D. Gradmann, D. Sanders and C.L. Slayman (1981)
Interpretation of current-voltage relationships for "active"
ion transport systems: I. Steady-state reaction kinetic analysis
of class-I mechanisms, J.Membrane Biol. 63 163-190
10. Huxley, A.F. (1959) Ion movements during nerve activity, Ann.N.Y.
Acad.Sci. 81 221-246
11. Keifer, D.W. and R.M. Spanswick (1978) Activity of the electrogenic
pump in Chara corallina as inferred from measurements of the
membrane potential, conductance, and potassium permeability,
Plant Physiol. 62 653-661
12. ----- (1979) Correlation of adenosine
triphosphate levels in Chara corallina with the activity of
electrogenic pump, Plant Physiol. 64 165-168
13. Kerkut, G.A. and R.C. Thomas (1965) An electrogenic sodium pump in
snail nerve cells, Comp.Biochem.Physiol. 14 167-183
14. Kernan, R.P. (1962) Membrane potential changes during sodium
transport in frog sartorius muscle, Nature, Lond. 193
986-987

15. Kimmich, G.A., J. Randles and J.S. Brand (1975) Assay of picomole amounts of ATP, ADP, and AMP using the luciferase enzyme system, Analytical Biochem. 69 187-206
16. Kishimoto, U. (1959) Electrical characteristics of Chara corallina, Ann. Rep. Scient. Works, Fac. Sci. Osaka Univ. 7 115-146
17. Kitasato, H. (1968) The influence of H^+ on the membrane potential and ion fluxes of Nitella, J. Gen. Physiol. 52 60-87
18. Miyamoto, H., T. Ikehara, T. Sakai and H. Yamaguchi (1976) Studies on simplified procedures for extraction and sensitive assay of adenine nucleotides in cultured mammalian cells, Acta medica Kinki Univ. 1 75-85
19. Mummert, H., U.-P. Hansen and D. Gradmann (1981) Current-voltage curve of electrogenic Cl^- pump predicts voltage-dependent Cl^- efflux in Acetabularia, J. Membrane Biol. 62 139-148
20. Rapoport, S.I. (1970) The sodium-potassium exchange pump: Relation of metabolism to electrical properties of the cell, I. Theory, Biophys. J. 10 246-259
21. Saito, K. and M. Senda (1973) The effect of external pH on the membrane potential of Nitella and its linkage to metabolism, P.C.P. 14 1045-1052
22. Sanders, D. (1980) The mechanism of Cl^- transport at the plasma membrane of Chara corallina: II. Cotransport with H^+ , J. Membrane Biol. 53 129-141
23. Sanders, D. and U.-P. Hansen (1981) Mechanism of Cl^- transport at the plasma membrane of Chara corallina: II. Transinhibition and the determination of H^+/Cl^- binding order from a reaction kinetic model, J. Membrane Biol. 58 139-158
24. Shimmen, T. and M. Tazawa (1977) Control of membrane potential and excitability of Chara cells with ATP and Mg^{++} , J. Membrane Biol. 37 167-192
25. Slayman, C.L. (1965) Electrical properties of Neurospora crassa. Respiration and the intracellular potential, J. Gen. Physiol. 49 93-116
26. ----- (1973) Adenine nucleotide levels in Neurospora, as influenced by conditions of growth and by metabolic inhibitors, J. Bact. 114 752-766
27. Stockdale, M., A.P. Dawson and M.J. Selwyn (1970) Effects of trialkyltin and triphenyltin compounds on mitochondrial respiration, Eur. J. Biochem. 15 342
28. Tazawa, M., U. Kishimoto and M. Kikuyama (1974) Potassium, sodium and chloride of Characeae, P.C.P. 15 103-110
29. Walker, N.A. and F.A. Smith (1975) Intracellular pH in Chara corallina measured by DMO distribution, Plant Science Letters 4 125-132
30. Ohkawa, T. and U. Kishimoto (1975) Anode break excitation in Chara membrane, P.C.P. 16 83-91

和文引用文献

1. 大川和秋・岸本卯一郎 (1973)

生体膜の興奮の一側面 その1。過分極反応
生物物理 13巻 11-26

2. 岡本 尚(1975)

植物にみられる起電性イオンポンプ
生物物理 15巻 13-24

3. 香川 靖雄 (1978)

生体膜、岩波書店

4. 田沢仁・新免輝男 (1977)

内部灌流法による植物細胞膜特性の研究
生体の科学 28巻 53-63

5. 田沢仁・新免輝男 (1981)

植物細胞における膜電位の発生機構と制御
膜 6巻 240-252

謝 辞

本研究は大阪大学教養部生物学教室の岸本卯一郎教授の指導のもとでおこなわれたものである。共同研究者として常に有意義な議論と指導をしていただいた岸本教授、竹内裕子さんそして大川和秋博士に感謝いたします。

また、実験上の便宜を図り有益な議論をしていただいた大沢文夫教授、葛西道生教授をはじめ大沢研究室の皆様感謝いたします。特に、マイクロコンピュータに先鞭をつけていただいた正井純次さん、プログラム開発に協力していただいた大阪医科大学教養部生物学教室の岩崎尚彦教授、浅井一視さん、吉田秀世さんに感謝します。近畿大学医学部の宮本博司教授と酒井鉄博さんにはATP定量法の指導と混合セルの供与に感謝いたします。

最後に、この研究をまとめる上でお世話になりました岸本研究室の秘書、津田ひろ子さん、と4年生の筒井泉雄さんにお礼申し上げます。

