OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

博士学位論文

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

博士学位論文

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$150\,\mu S/cm^2$から$60\,\mu S/cm^2$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(2,4DNP)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℃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はなくて直接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、膜を透過するいかなる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み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になっているか、(5)受動チャン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。この様な系では、膜電位は、最も正側の平衡電位と最も負側の平衡電位の中間にある。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

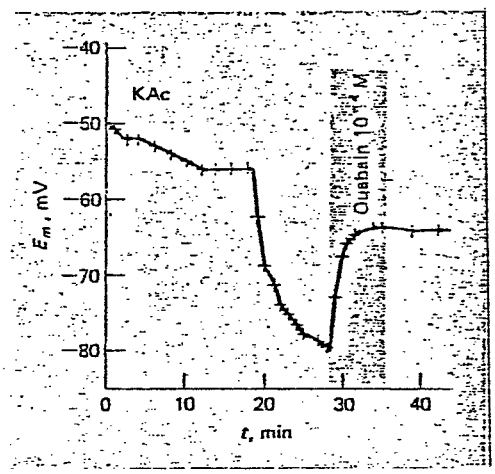


図 1-1　K^+, Na^+ を細胞内に注入した時のカタツムリの神経細胞の膜電位変化。0分で K^+, 約20分で Na^+ を注入。

〔Kerkut (1965)〕

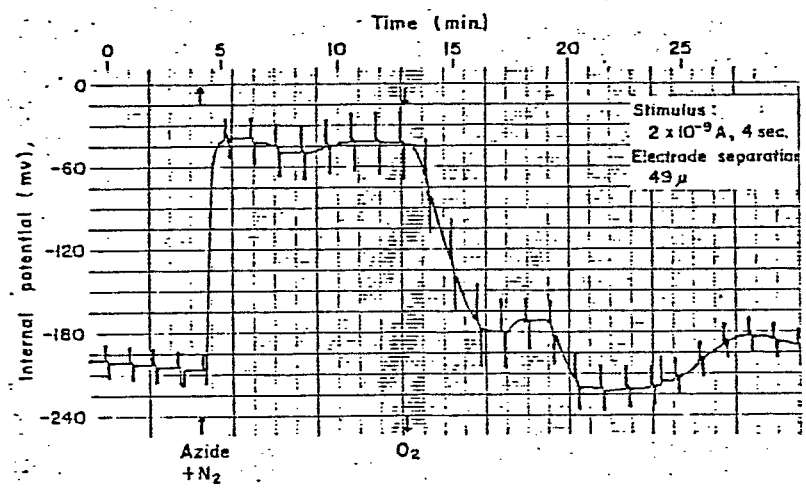


図 1-2　アカパンカビに NaN_3 をあたえた時の膜電位と膜抵抗の変化。

〔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ンの添加によって急速に失なわれる。(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(−200mV以上)が、エネルギー代謝を阻害すると−10mV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−188mV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、−180mV〜−220mVなのにE_Kは−180mV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を示し

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 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を示した。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+5μMCCCP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の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。カラ・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ざるを得なかった。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っ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って数モルの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。と言うことは、輸送の為の化学反応の速度が電場によっ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と考えるべきである。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、内部抵抗をもっ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

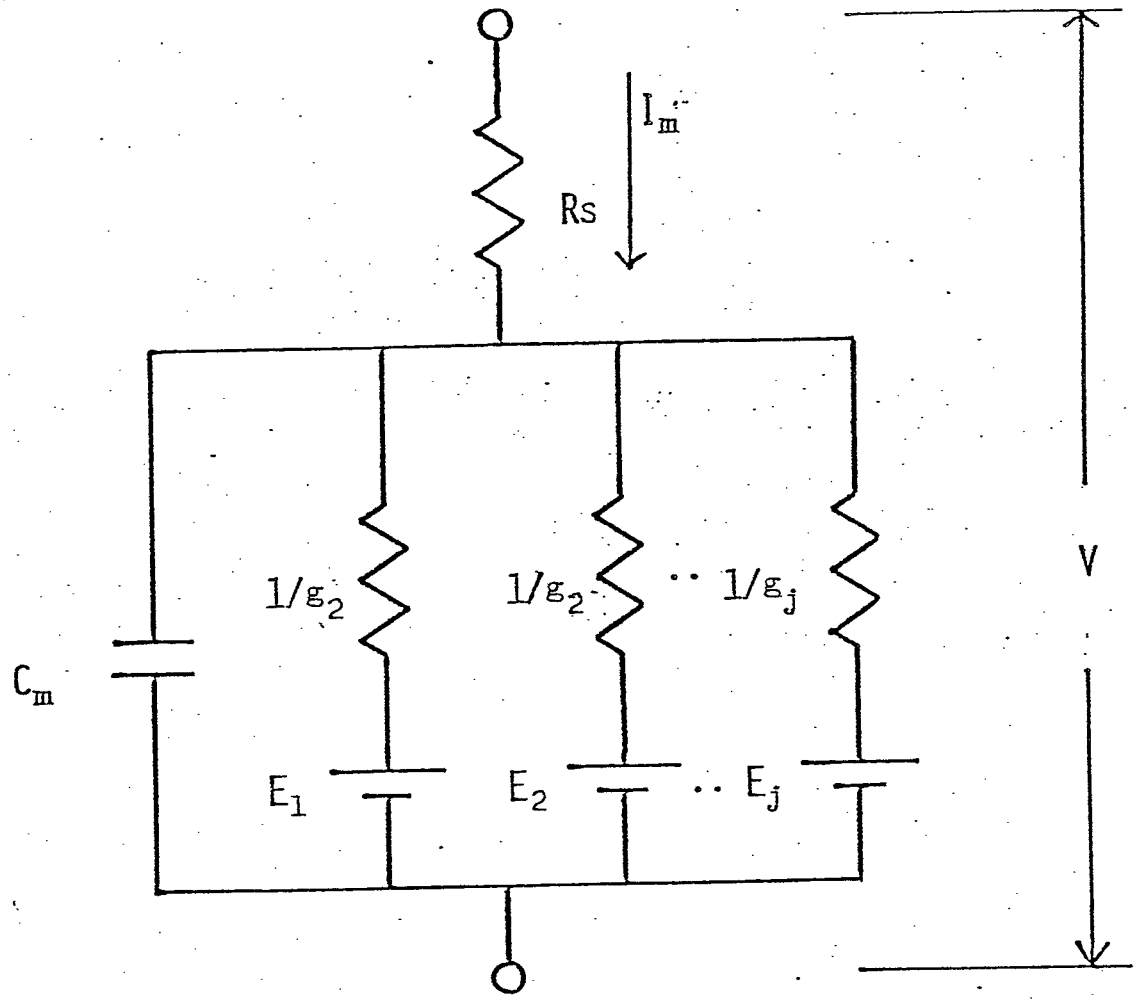
はいけない。

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

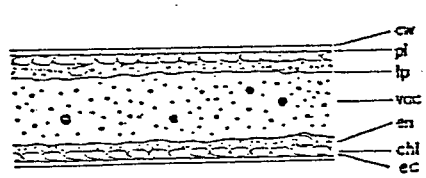
電気生理学の手法に、環境条件をかえて、膜電位が変化したということから、その原因がどこにあるかという議論の仕方がある。一般に、膜の等価回路はHodgkin and Huxley の神経モデル(H-Hモデル)でも示されているように、種々の成分(一つの成分は、抵抗と起電力が直列に並んだもの)が並列にならんでいるものとして表現できる(図2-1)。この回路の起電力Eとコンダクタンスgは、図中の式の様に書ける。この式から、Eの変化だけから、どの成分のコンダクタンスが変化したのか、どの成分の起電力が変化したのか想像しにくい。そのような時、コンダクタンスgの変化も同時に測定しておくと、どの成分が影響をうけたの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



cw: 細胞壁, *pl*: 原形質膜, *tp*: 液胞膜, vac. 液胞,
en: 内質, chl: 葉緑体, 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いう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、ヤツメウナギ筋間細胞の活動電位と、ともに、膜コンダクタンス

などが、どの様に変化するかが正確に決められる。

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（トノプラスト）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 Butter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^+ 112mM, Na^+ 3mM, Cl^- 24mM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、アルカリで電解研摩して細くしたタングステン線を用いた。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。電流電極の長さと配置は、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7mmとした。膜電位は、3MKCl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/

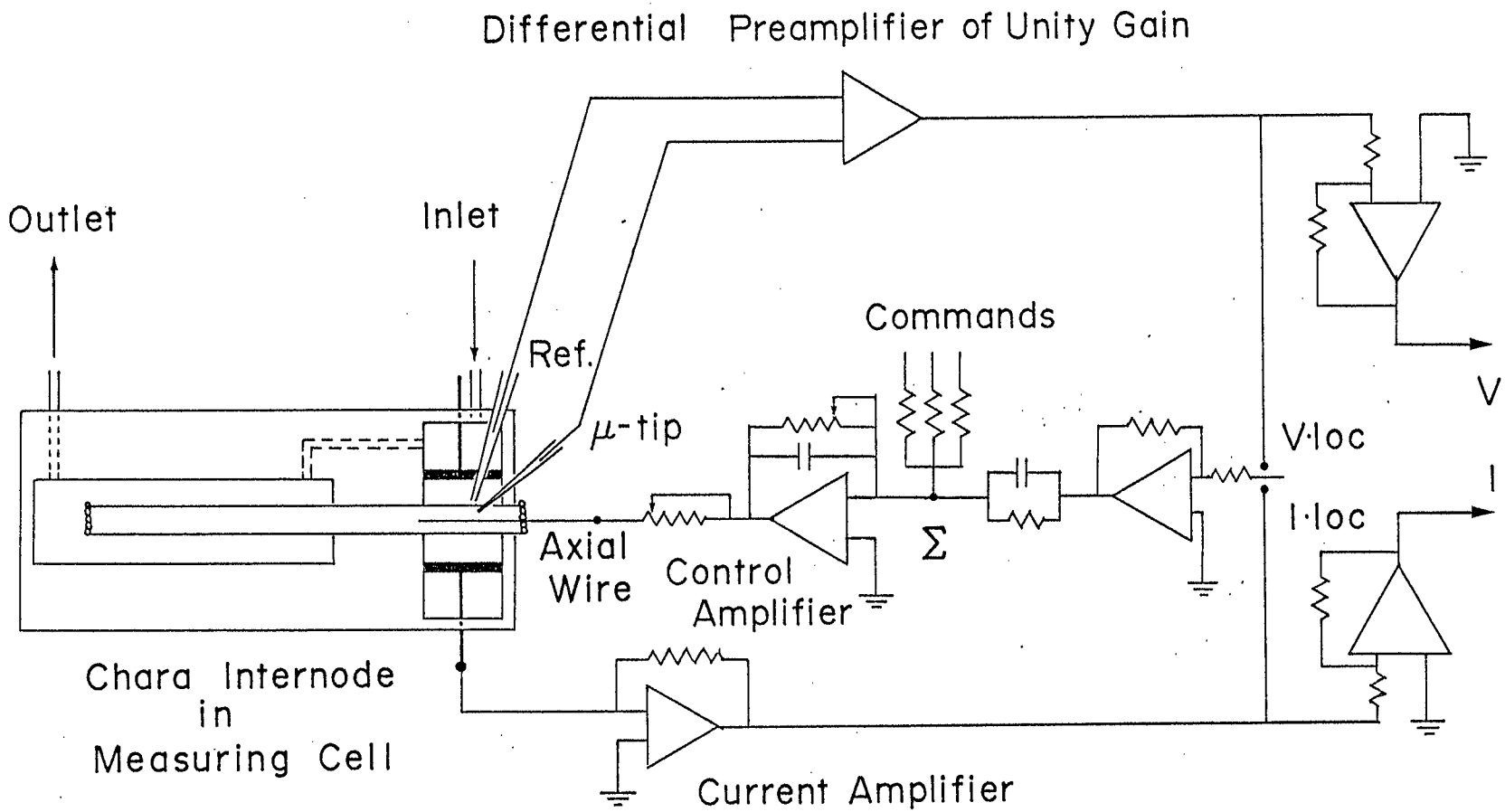


図 2-3　電流 - 電圧固定回路と実験セル

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(クールニクス)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(50μsec)。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って行なった。テストパルスも同様に、コマンド点から適当な中と振幅で与えた。

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。小さい電流の摂動i_0を与えた時の電圧応答vは

$$v = i_0 Z + I \cdot \Delta Z + \Delta E$$

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i_0をできるだけ小さくすることによって、大きくならない様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

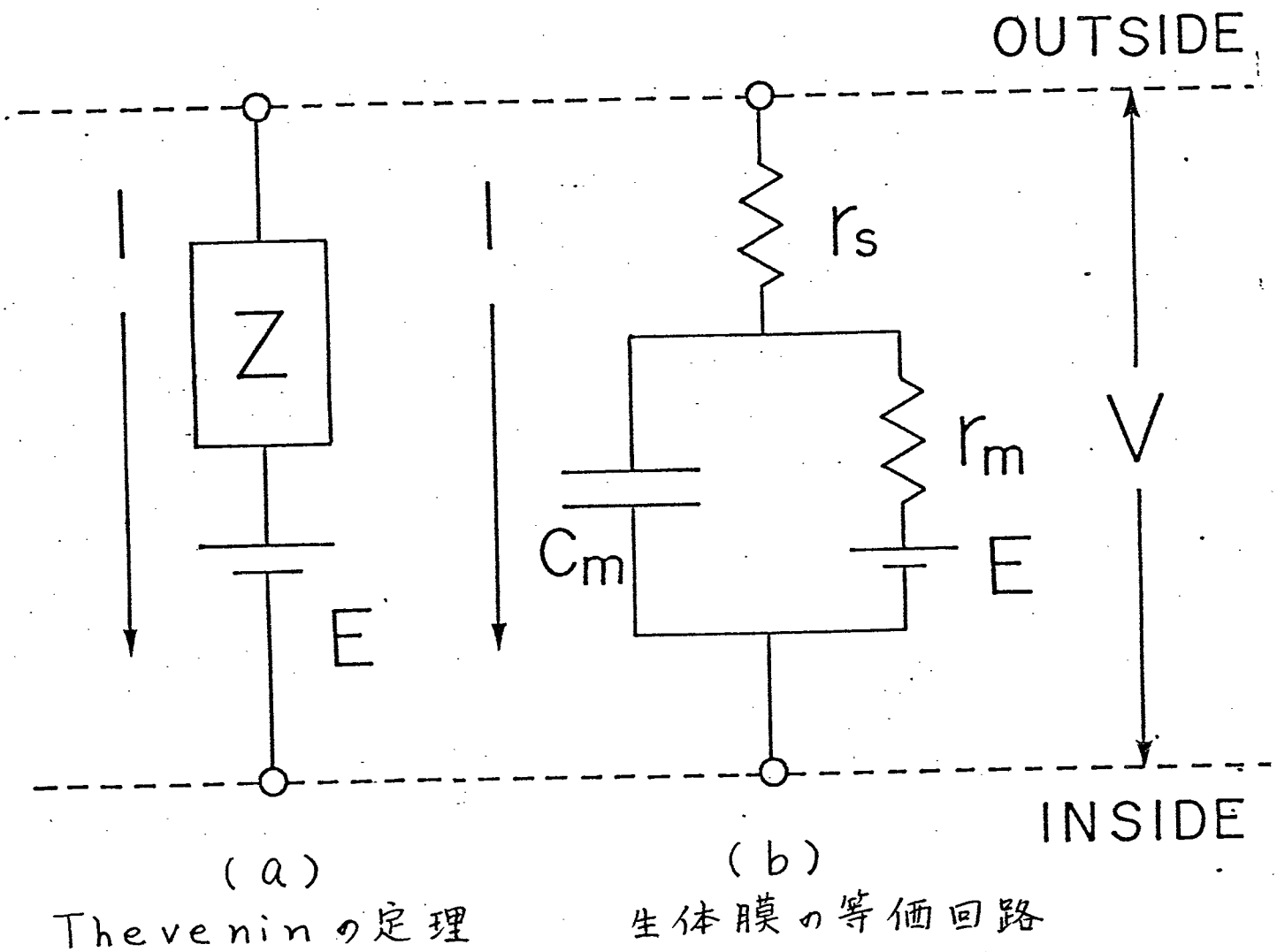


図 2-4　膜の等価回路

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撹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_o を流した時の電圧応答、$V(t)$ は、近似的に

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

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)によって、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ー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クイジョンシステム（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、メイ

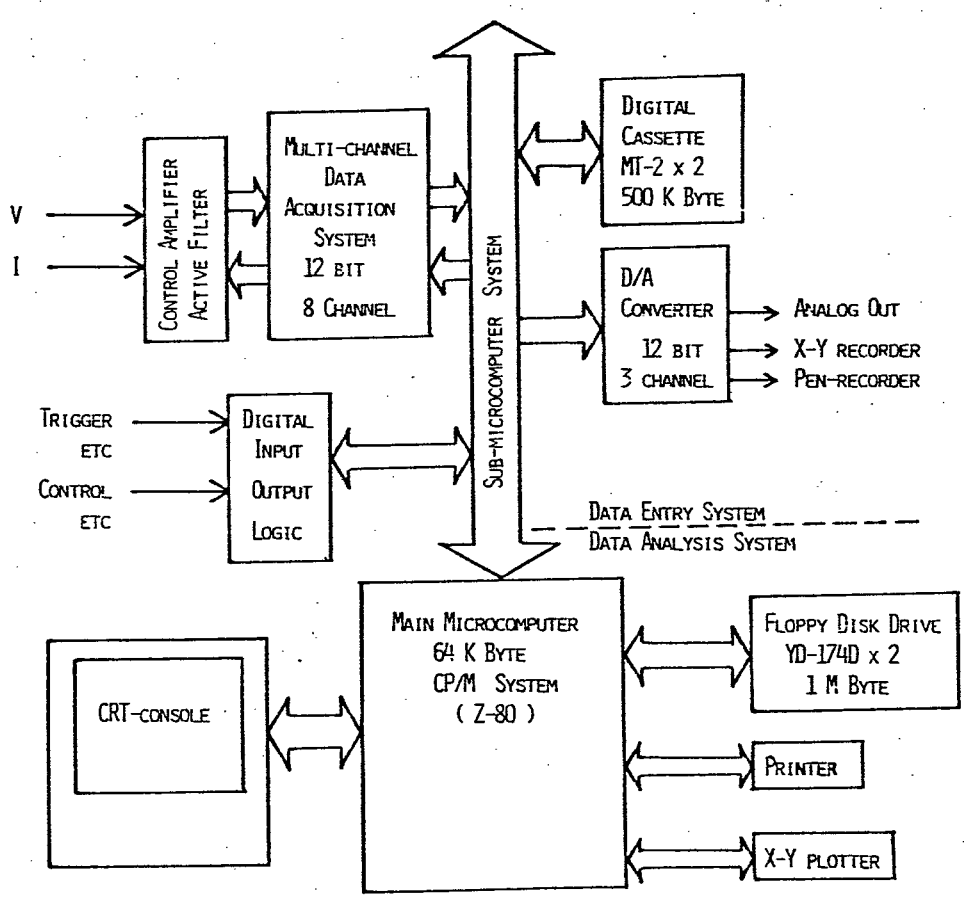


図 2-5　データ解析システム

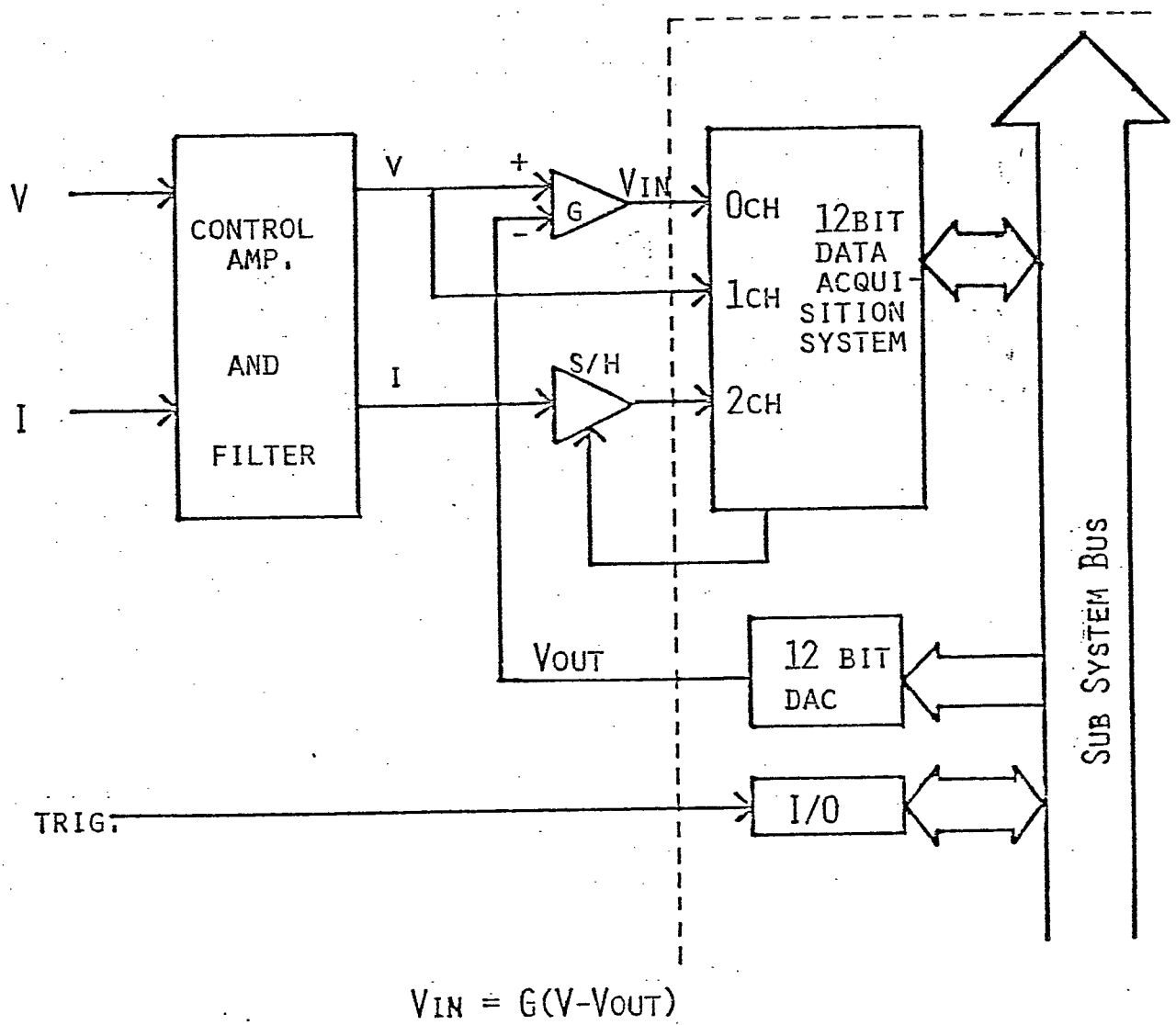


図 2-6　高分解能電圧取込み回路

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巾するだけで取込んでもいいが、Vの取りうる範

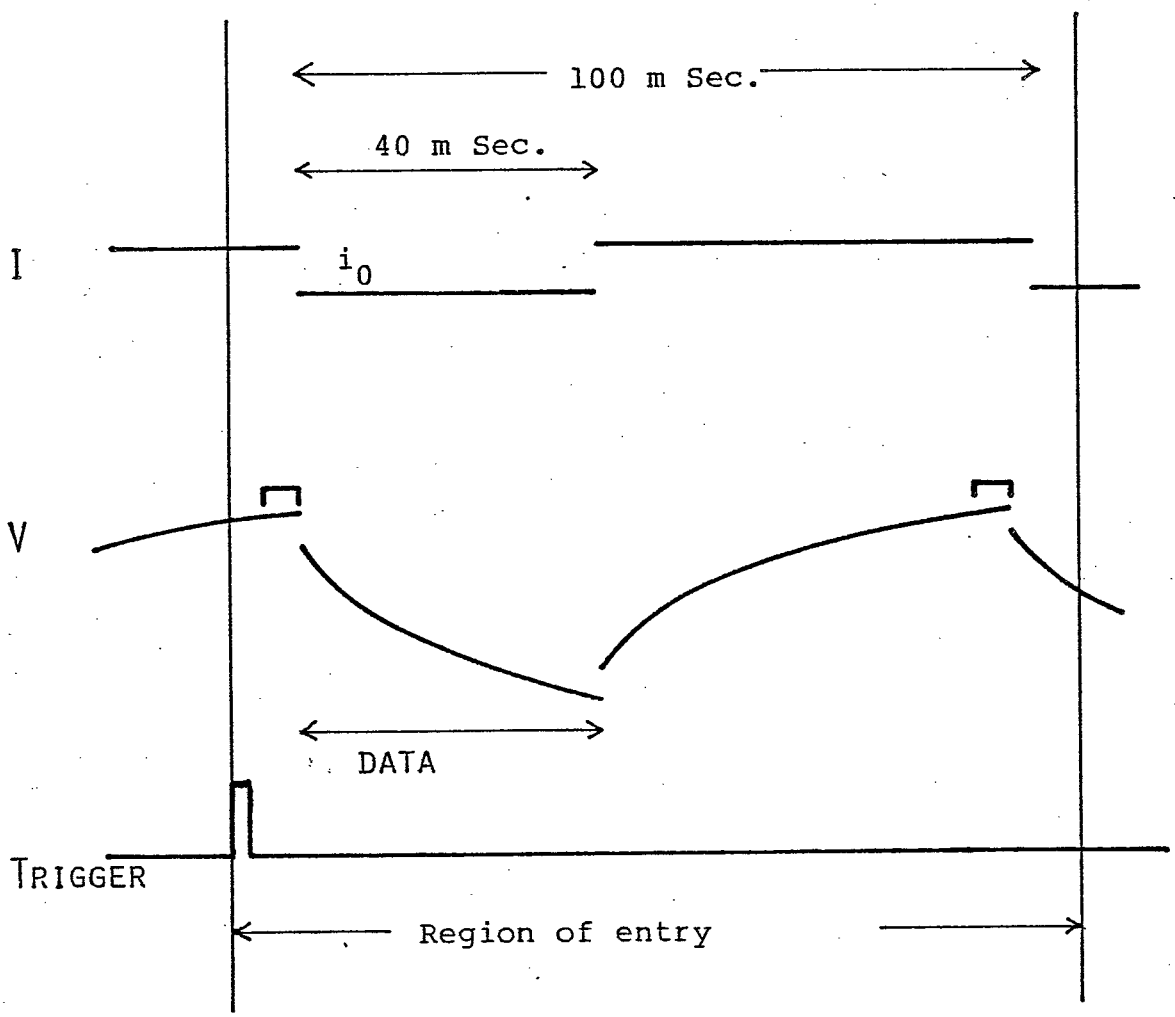
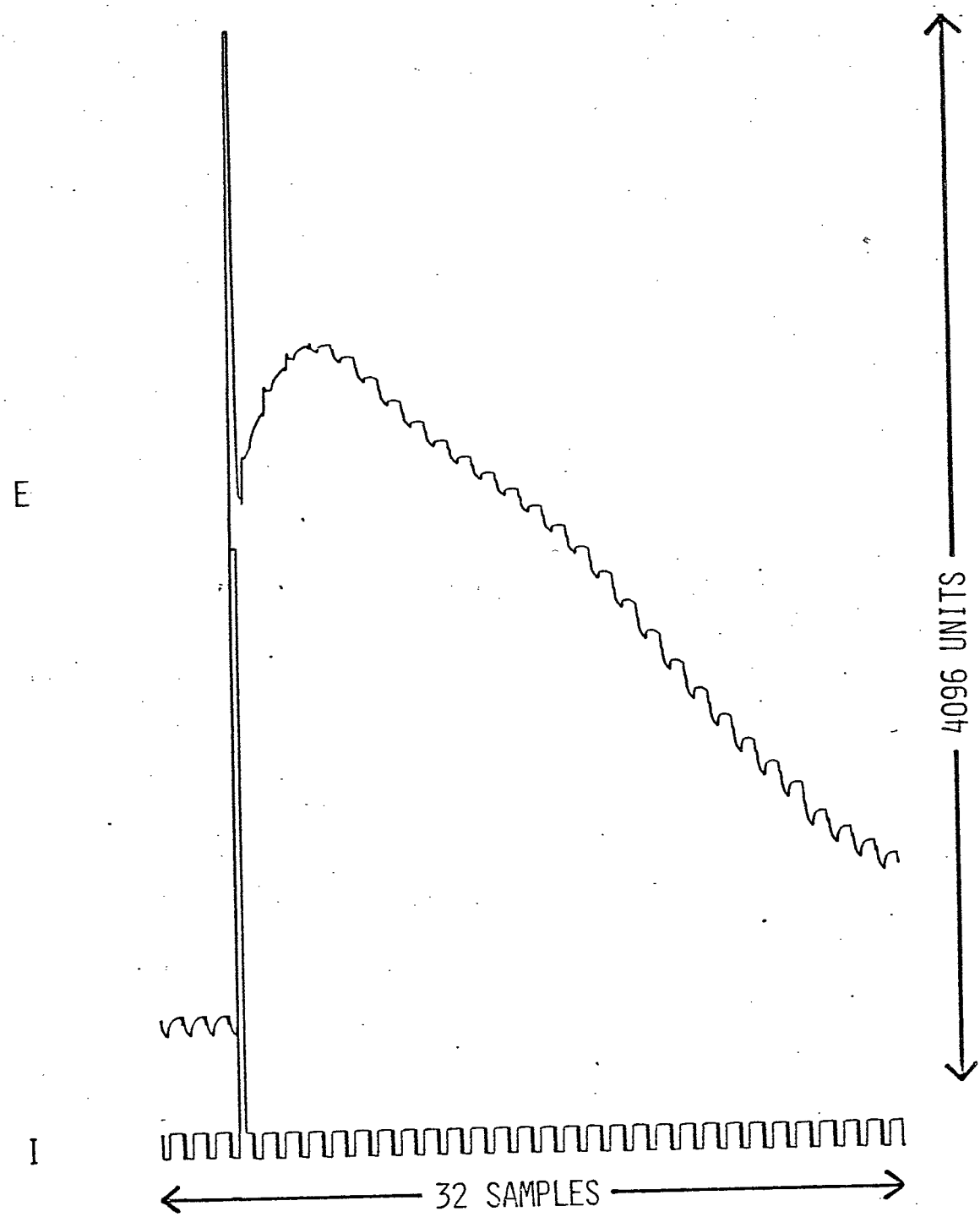


図2-7　トリガーとテストパルス、
電圧応答の時間関係の模式図
（i_0はテストパルスの振幅）

囲は−250mV～+10mVで、テストパルスに対する応答は、数mVなので、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1ch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0chから128点をサンプルする。$G\cdot(V-V_{out})$となった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16μV/unitの分解能となった。Iの取込み部にはいっている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）



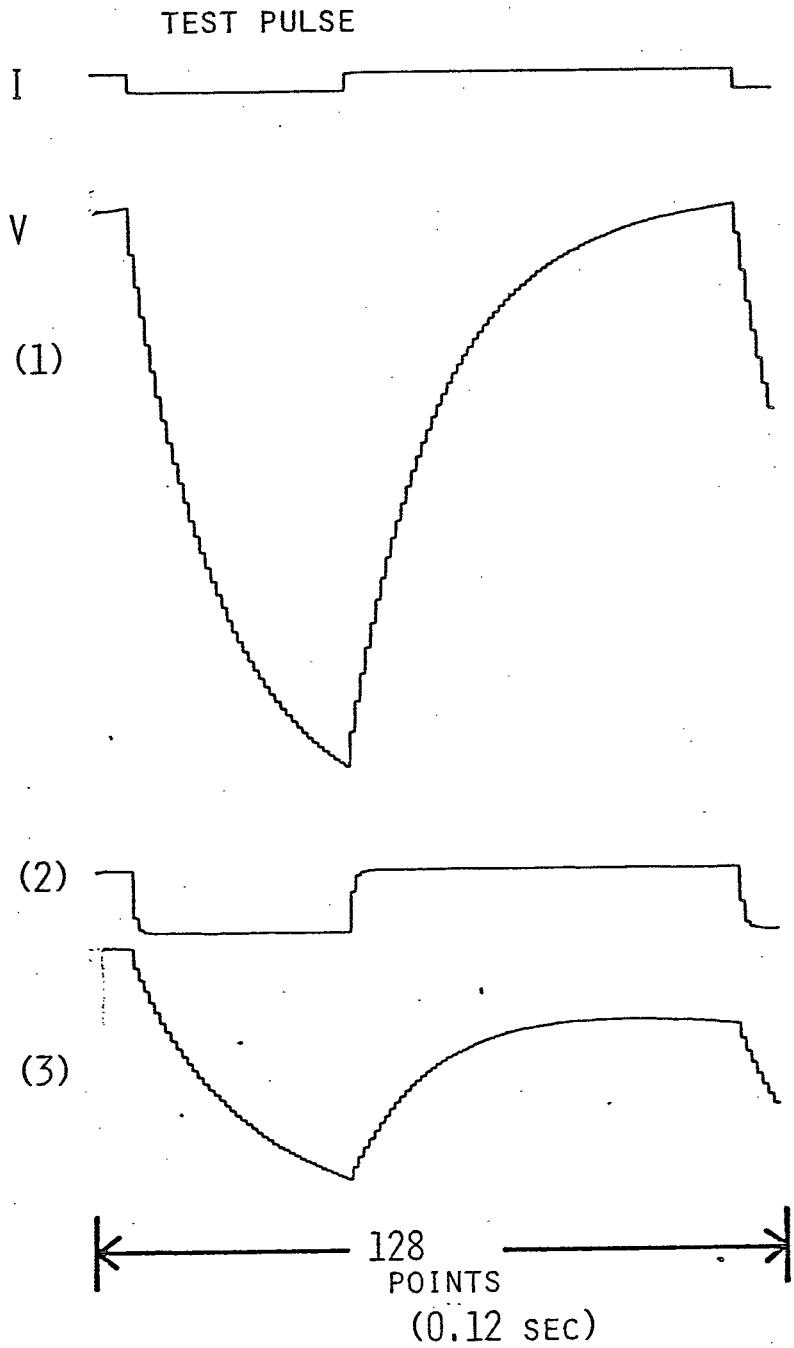


図 2-9　テストパルスに対する種々の応答の模式図

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)が活動電位のも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)の振巾が小さくなって時定数が小さくなっている場合は、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ボーのターミナルとして使用し、システムとの会話を行う)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、マクロアッセンブラ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

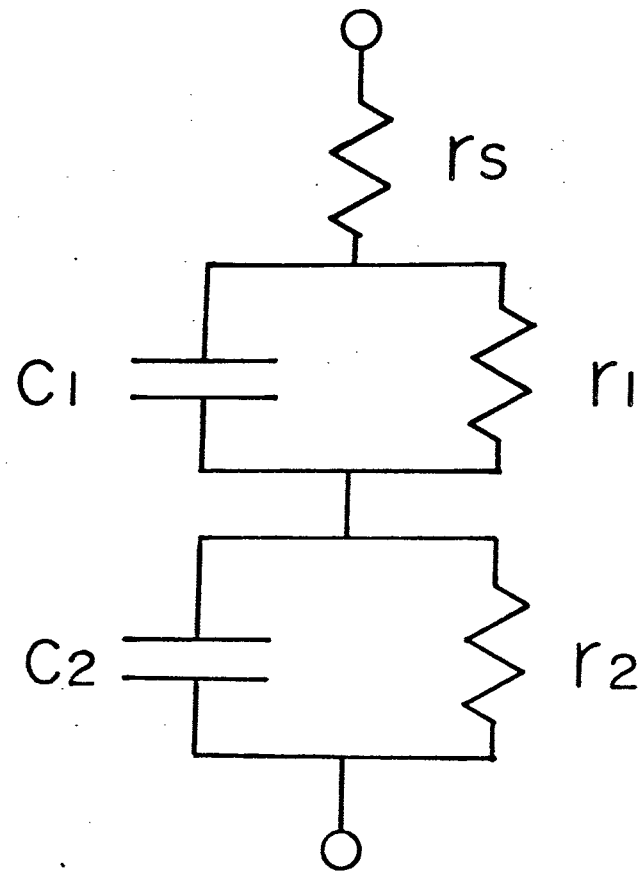


図 2 - 10

に速くなっている。

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Em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、Emの変化が直線的であるとして、図2-7のVの2ヶ所の"⌐"の間で直線回帰をして、これをEmの変化としてVから差引く。

ii) フィッティングは、"DATA"の部分について行う。通常データ数は40～50個となる。

iii) フィッティングは"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Emは省略してある。

iv) フィッティングで求めた、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 μA/cm²)、その巾は、38.6msec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。

$$V(t) = 4.334 - 3.84\, e^{-0.035t} \qquad [1]$$

(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

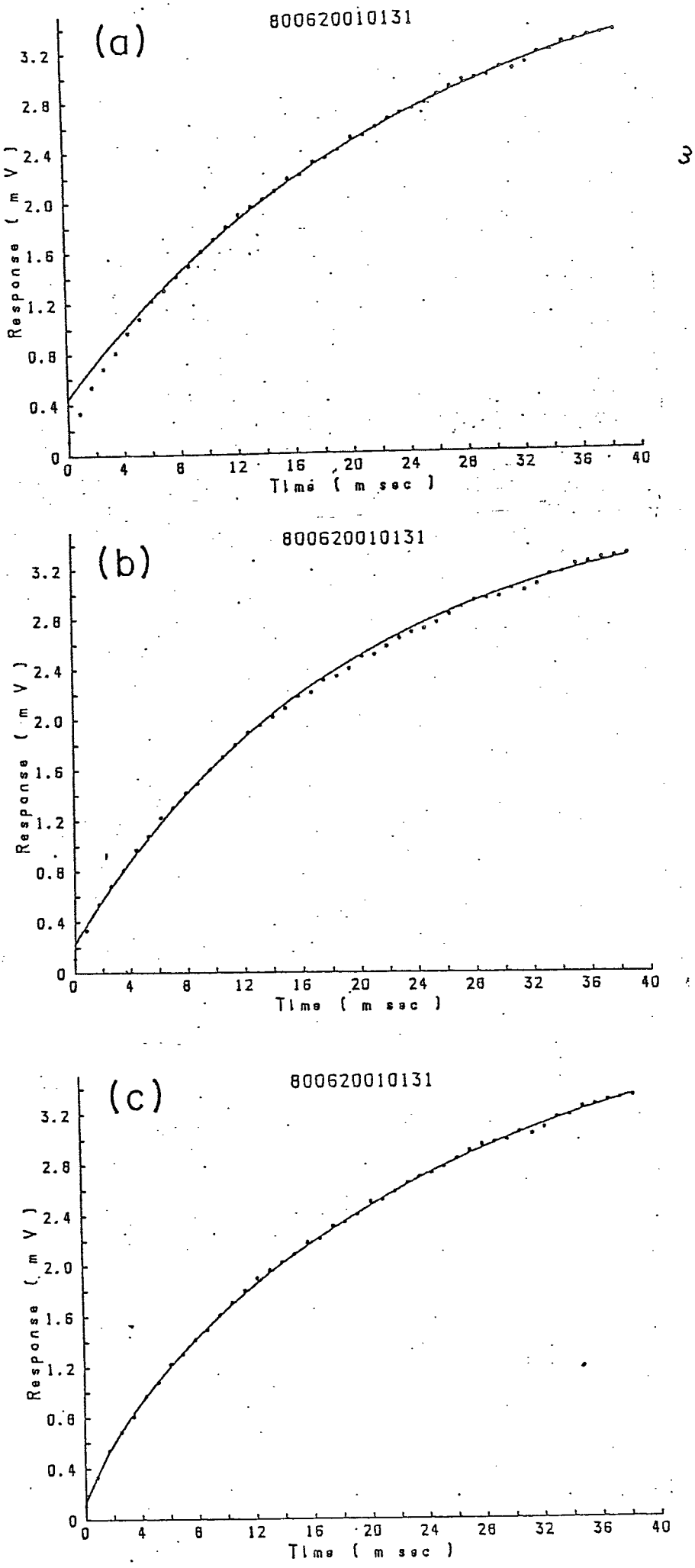


図 2-11　カーブフィッティング（点，：データ，実線：計算）

満足すべきものではない

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

(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。

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

(2)と(3)を比較すると、係数や時定数が少しづつ異なっている。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)の結果と近い。

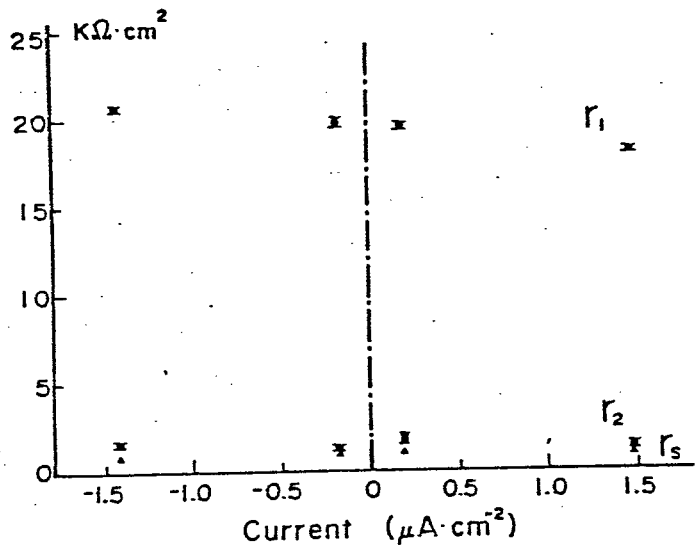


図 2-12　テストパルスの振幅と膜の抵抗成分の関係

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(±0.1~0.2μA/cm²)では、脱分極側と過分極側でr_1はあまり変らないが、大きい時(約±1.5μA/cm²)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、0.1~0.2μA/cm² 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

シャ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^+のイオノ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

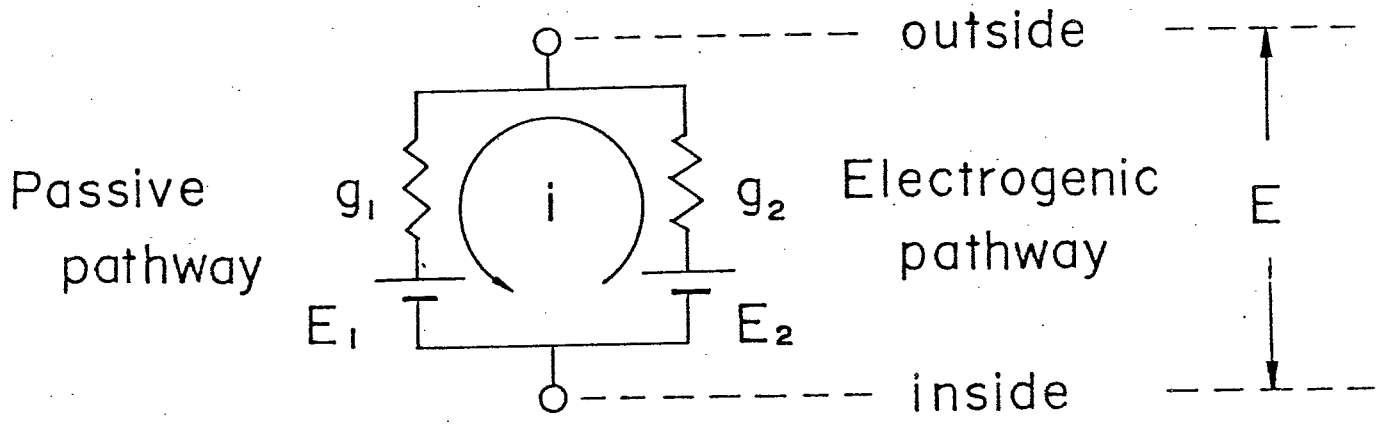


図 3-1　起電性イオンポンプを含む等価回路

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。このことを電気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。i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。

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

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

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

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

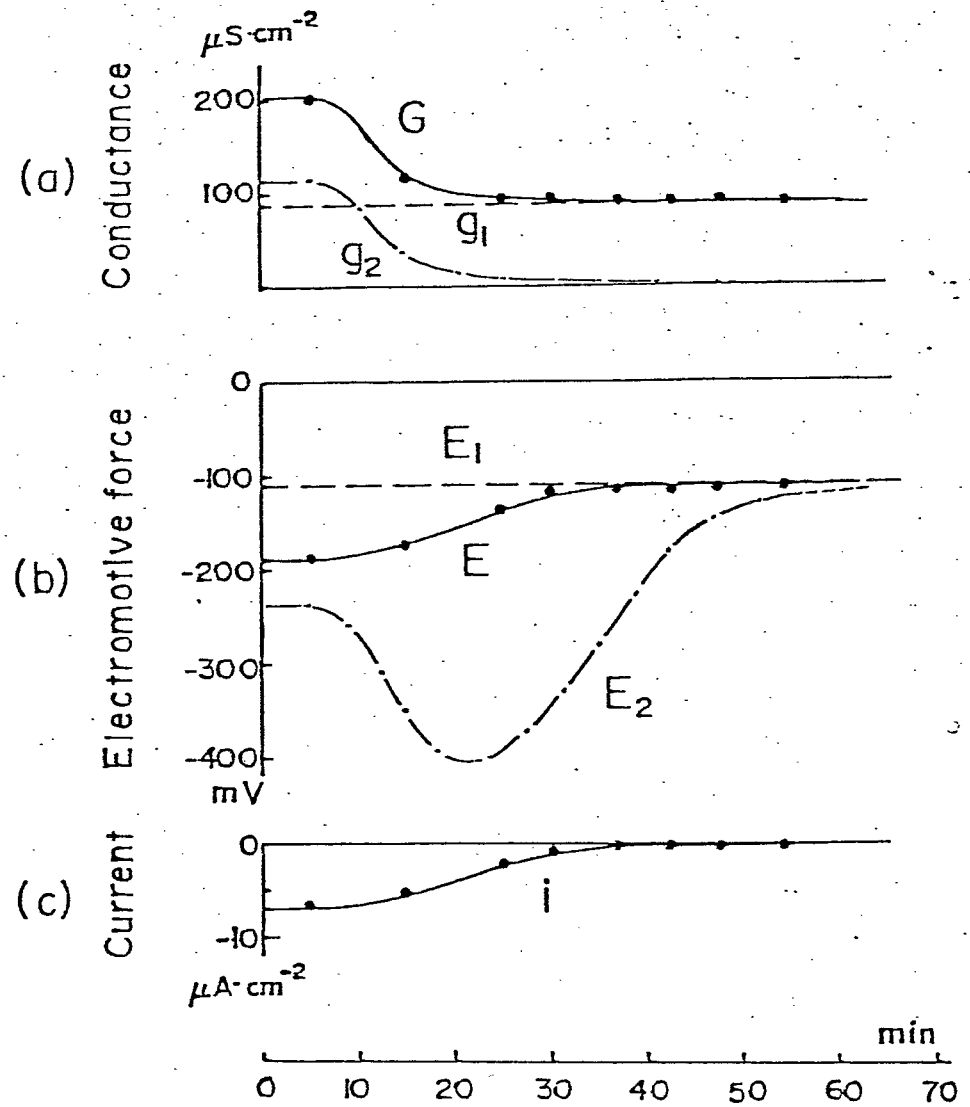


図 3-2　0.2 m MDNPで阻害した時のコンダクタンス(a), 起電力(b), ポンプ電流(c)の変化 [25℃]

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、

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

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

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って、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 0.2mM DNP を添加すると、約15分間で膜電位が −190mV から −110mV に脱分極した(図3-2)。コンダクタンスは 200 MS/cm² から 85μS/cm² 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ンネルの 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

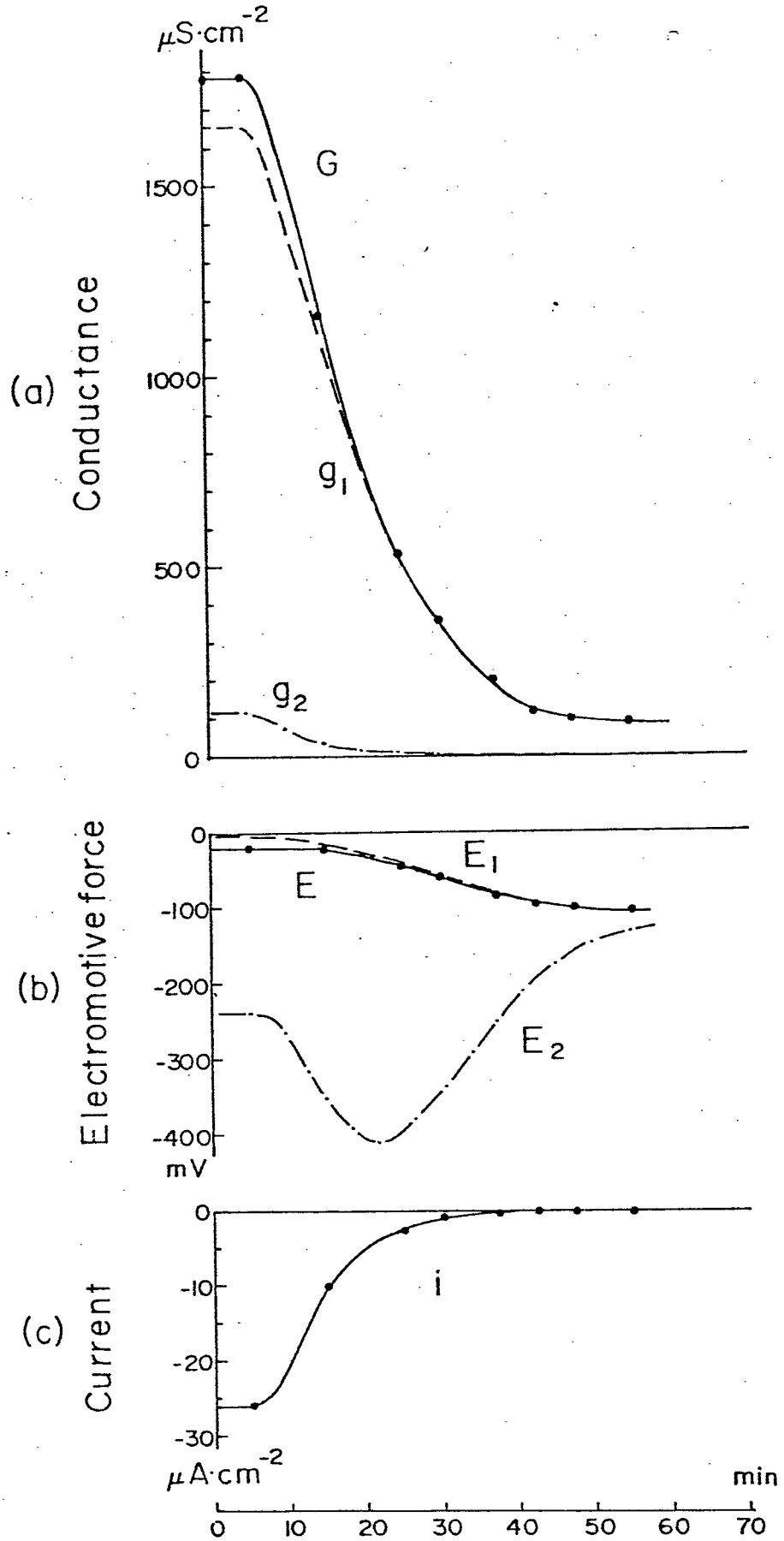


図 3－3　0.2mMDNP で阻害した時の活動電位ピークのコンダクタンス(a)，起電力(b)，ポンプ電流(c)の変化．
（図 3－2 と同じ材料）

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。ポンプ電流しは$-7\mu A/cm^2$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)。活動電位の振巾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させると、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ン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の時間変化が計算できる(図3-3の鎖線)。g_1が1650 $\mu s/cm^2$から100$\mu s/cm^2$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、受動チャン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すると、ほとんど効果がない。ミトコンドリアで通常用いられる濃度である。DNP

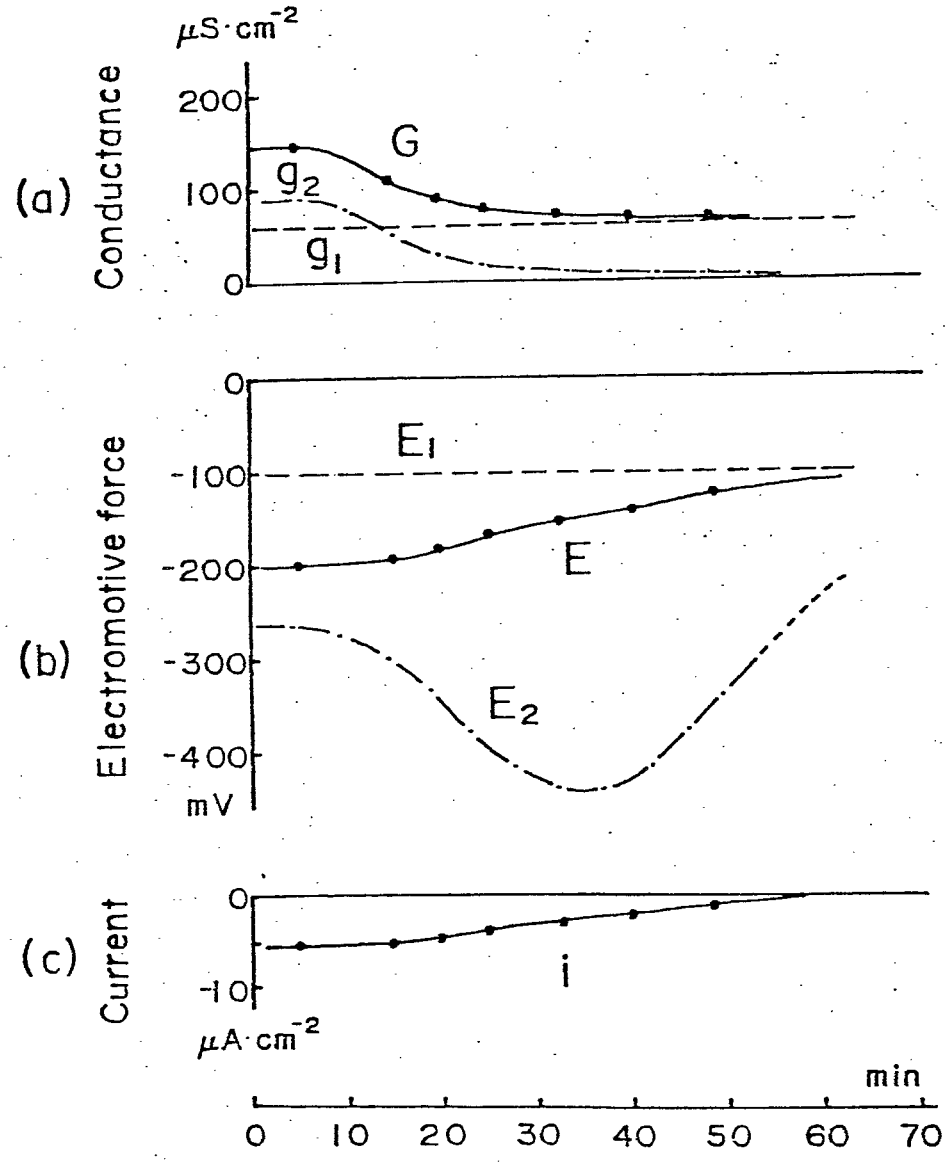


図 3-4　2μM TPC で阻害した時のコンダクタンス(a)
起電力(b), ポンプ電流(c)の変化 [25°C]

阻害は、DNPを除去して明条件(2000lux)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, CF_1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2μM・TPCを含んだAPW(pH7.7 Tricine)を流すと、膜電位は−200mVから−100mVに、脱分極し、膜コンダクタンスは150μS/cm²から、60μS/cm²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=60μS/cm², E_1=−100mV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。ポンプ電流しも同様に−5.7μA/cm²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、

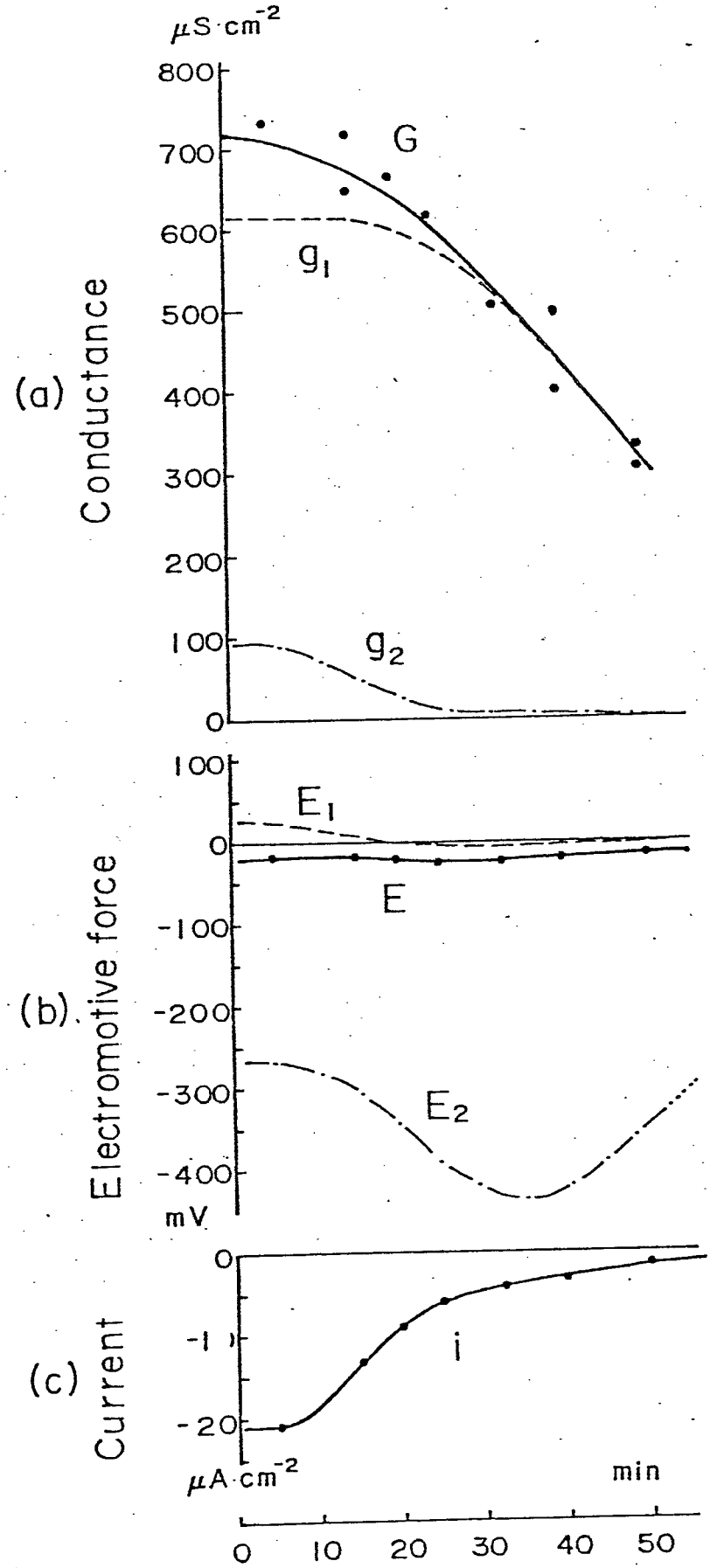


図 3-5　2μMTPCで阻害した時の活動電位ピークのコンダクタンス(a), 起電力(b), ポンプ電流(c)の変化.
(図3-4と同じ材料)

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、興奮性が失なわれず、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、ポンプ電流しも$-21\mu A/cm^2$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CF_1ではF_1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ではこの様なことはない。

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は興奮性を失なわせる。

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」としたことに反している。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、

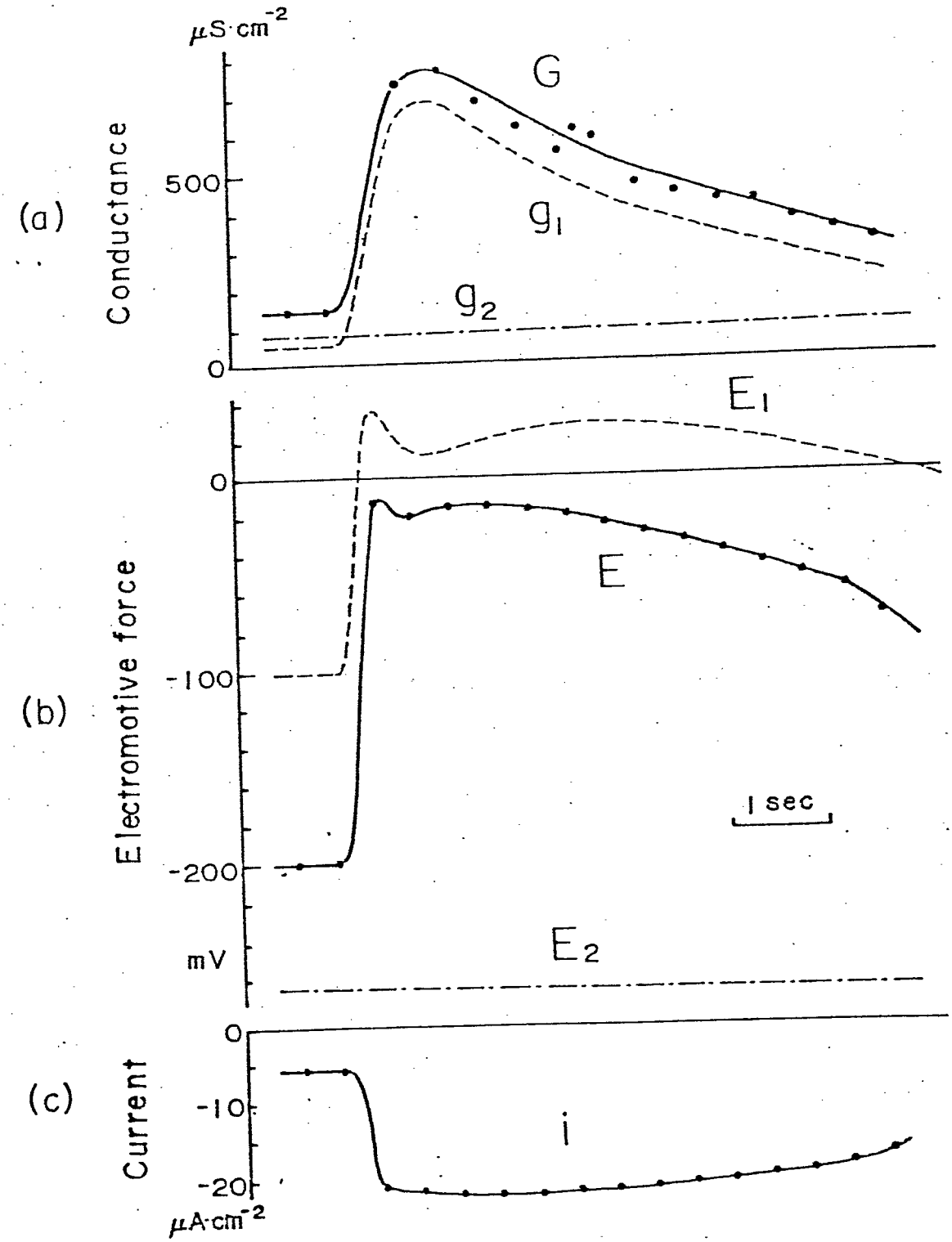


図 3-6　活動電位発生時の受動成分の変化
コンダクタンス(a)，起電力(b)，ポンプ電流
(c)．　[g_2，E_2 は　図 3-4 で求めた値]

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, 90μS/cm² であった。膜のコンダクタンスは100～200μS/cm²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_1 ($-100mV$) は、K^+ の平衡電位 E_K ($-180mV$) よりも脱分極側にある。これは E_1 が E_K だけで決まっているのではなくて、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、$g_K = 47.64 \mu S/cm^2$, $g_{Cl} = 12.35 \mu S/cm^2$ となる。6章の E_1 の pH 依存性から、受動成分の g_H は小さいと考えられる。起電性ポンプによって流れ出る電流は、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の変化や130mVは、神経細胞で一般に見られる活動電位の大きさとほぼ等しい。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ぱっている。

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

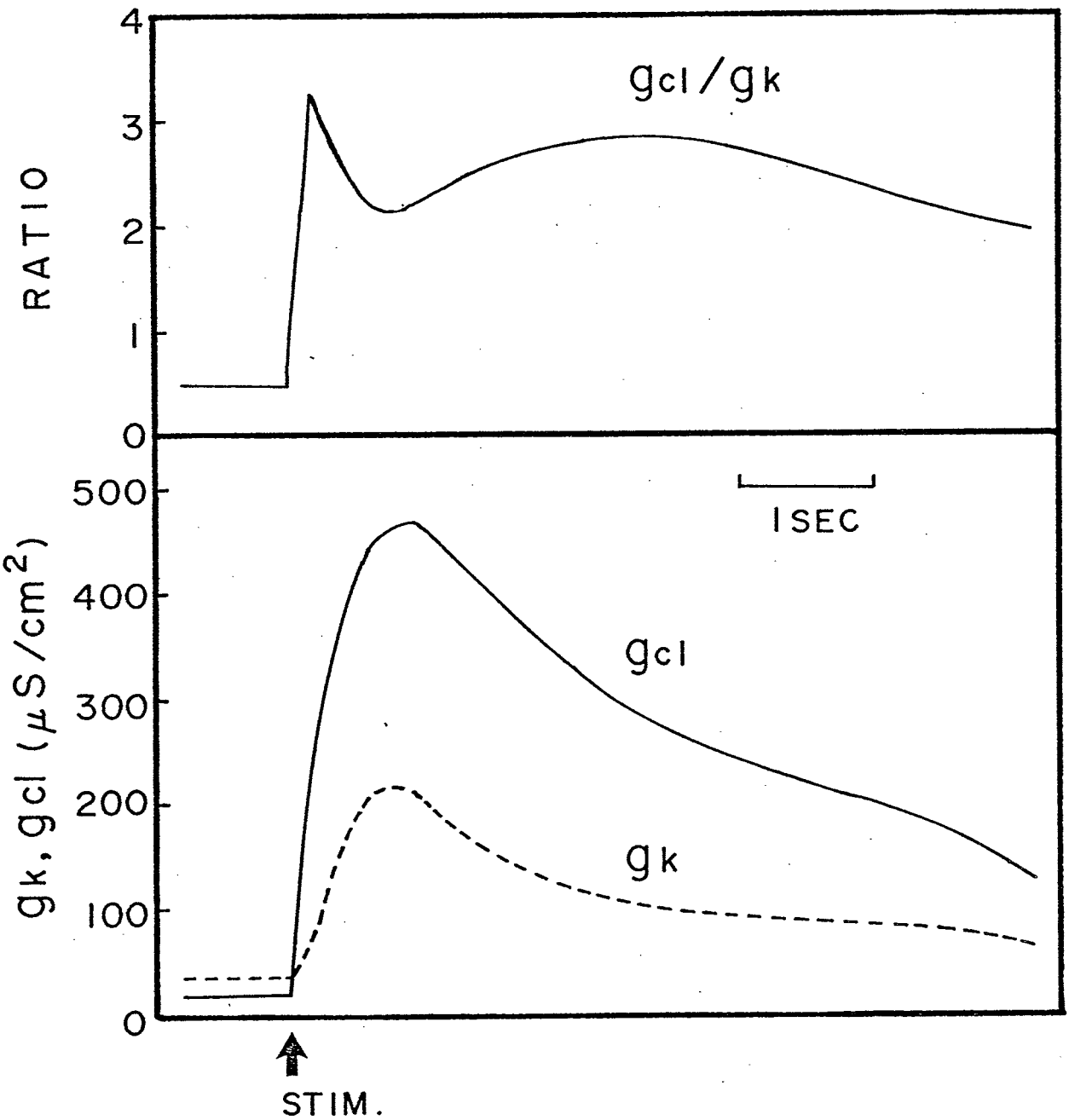


図 3-7　活動電位にともなう g_K, g_{Cl} の変化と g_{Cl}/g_K の変化〔図 3-6 のデータ〕

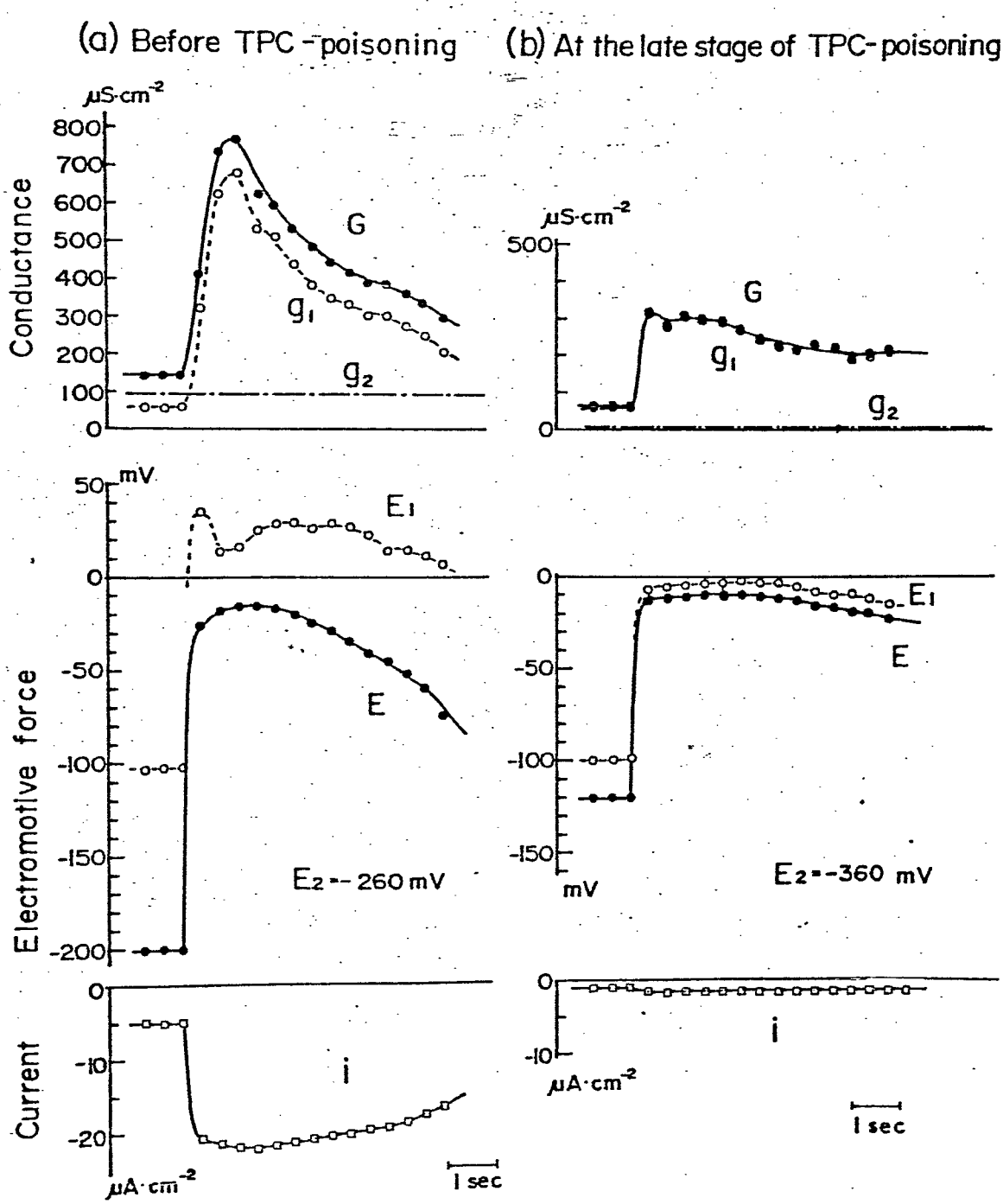


図 3-8　2μM TPC 阻害前後の活動電位

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は、Ca^{2+}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_{Ca}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_1のピークが一致していないのは、活動電位のピークがg_{Ca}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_1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っぱっているので、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の方向に引っぱられるので、活動電位をはやくおわ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。

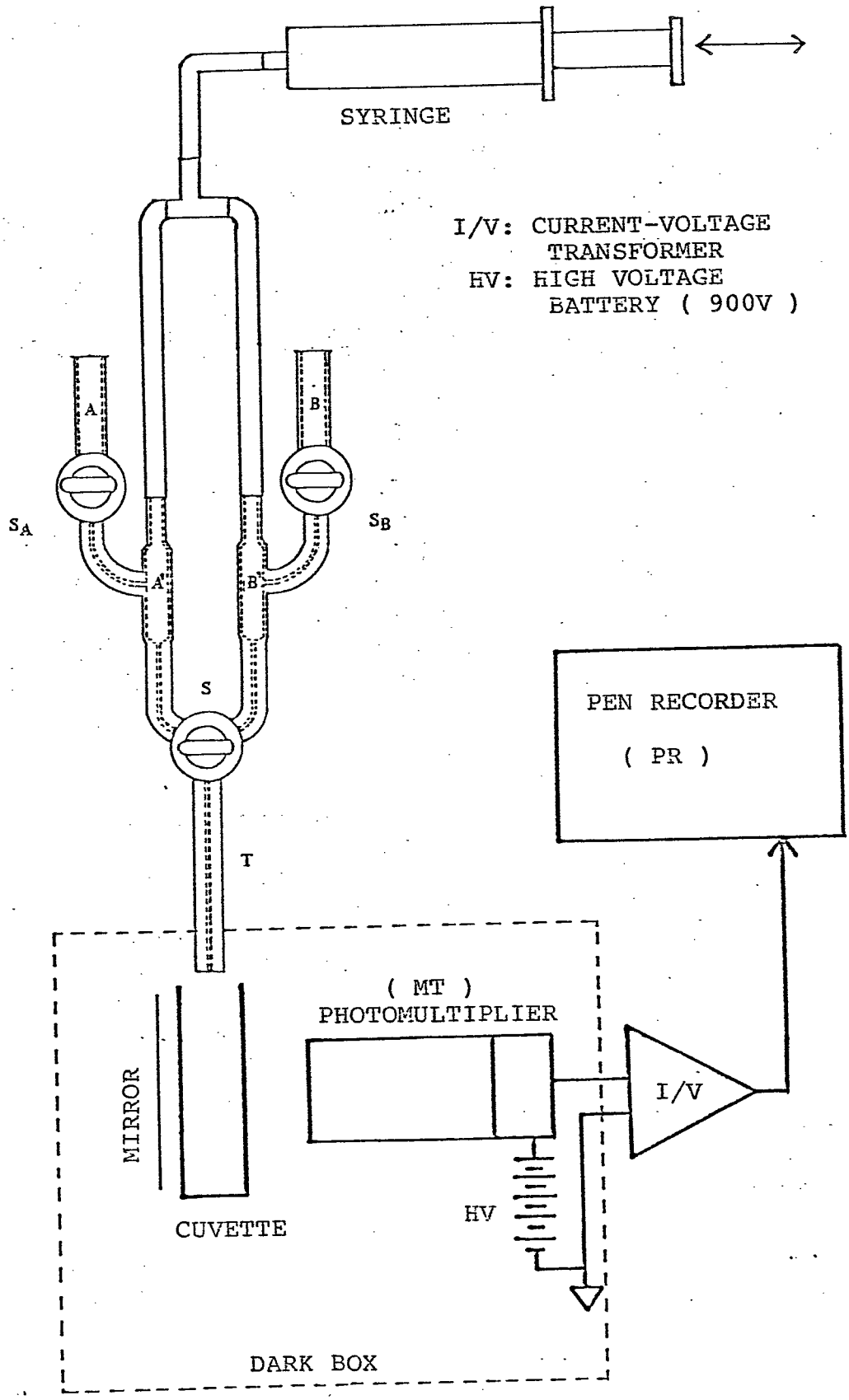

SYRINGE
I/V: CURRENT-VOLTAGE TRANSFORMER
HV: HIGH VOLTAGE BATTERY (900V)
A
B
S_A
S_B
A'
B'
S
T
PEN RECORDER
(PR)
(MT)
PHOTOMULTIPLIER
I/V
MIRROR
CUVETTE
HV
DARK BOX

図 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 $Ca_3(PO_4)_2$：1 g を加えてよく撹拌したのち、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 を 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増管（PM）

で測定した。

コック S_A, S_B, S を閉じて、A に、0.2 M 硫酸ナトリウム液 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}～10^{-3} 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

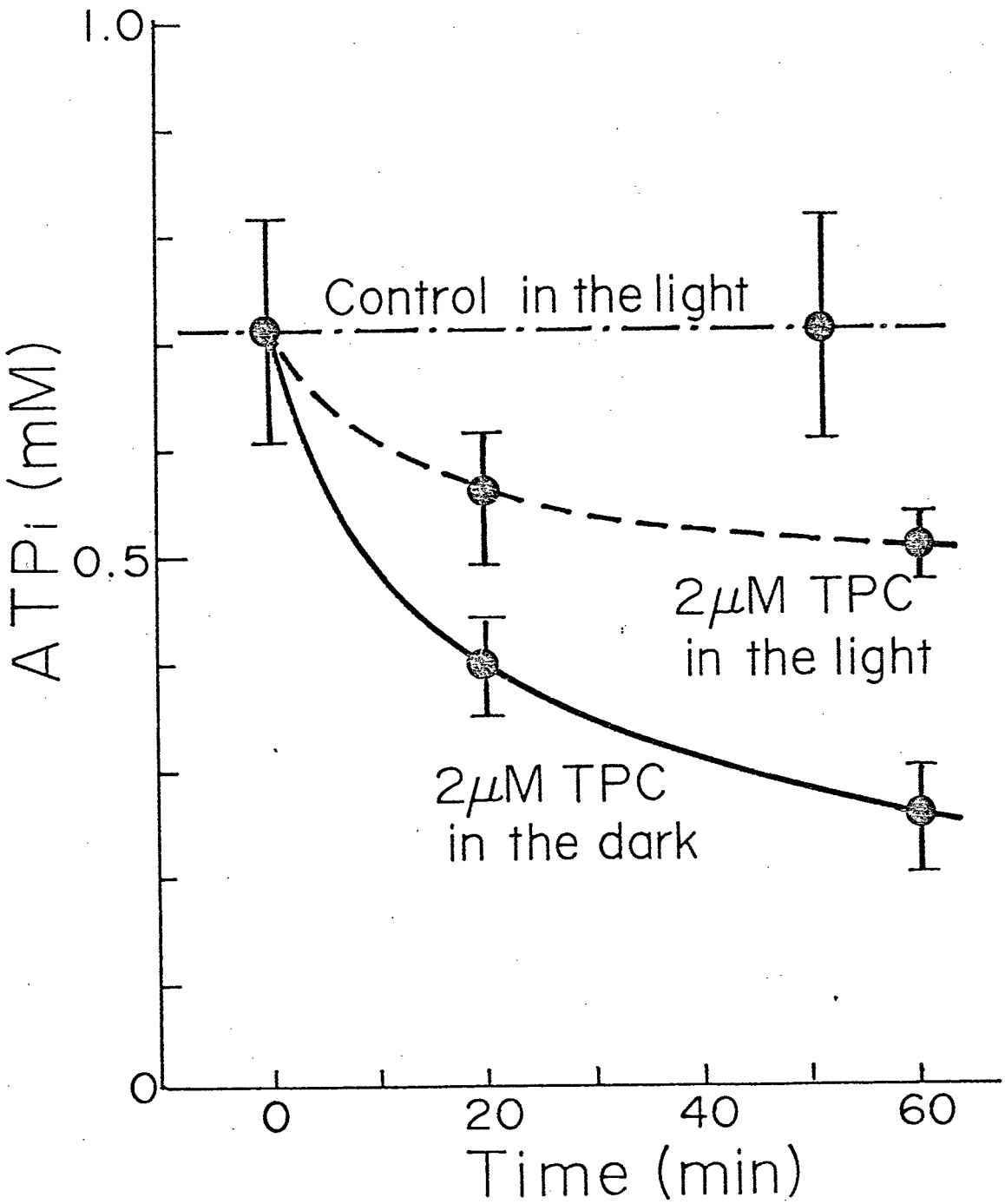


図 4-2　TPC阻害による細胞内ATP濃度の時間変化

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サンプル以上で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、0.7～1 mMであった。暗＋2 μM 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)。

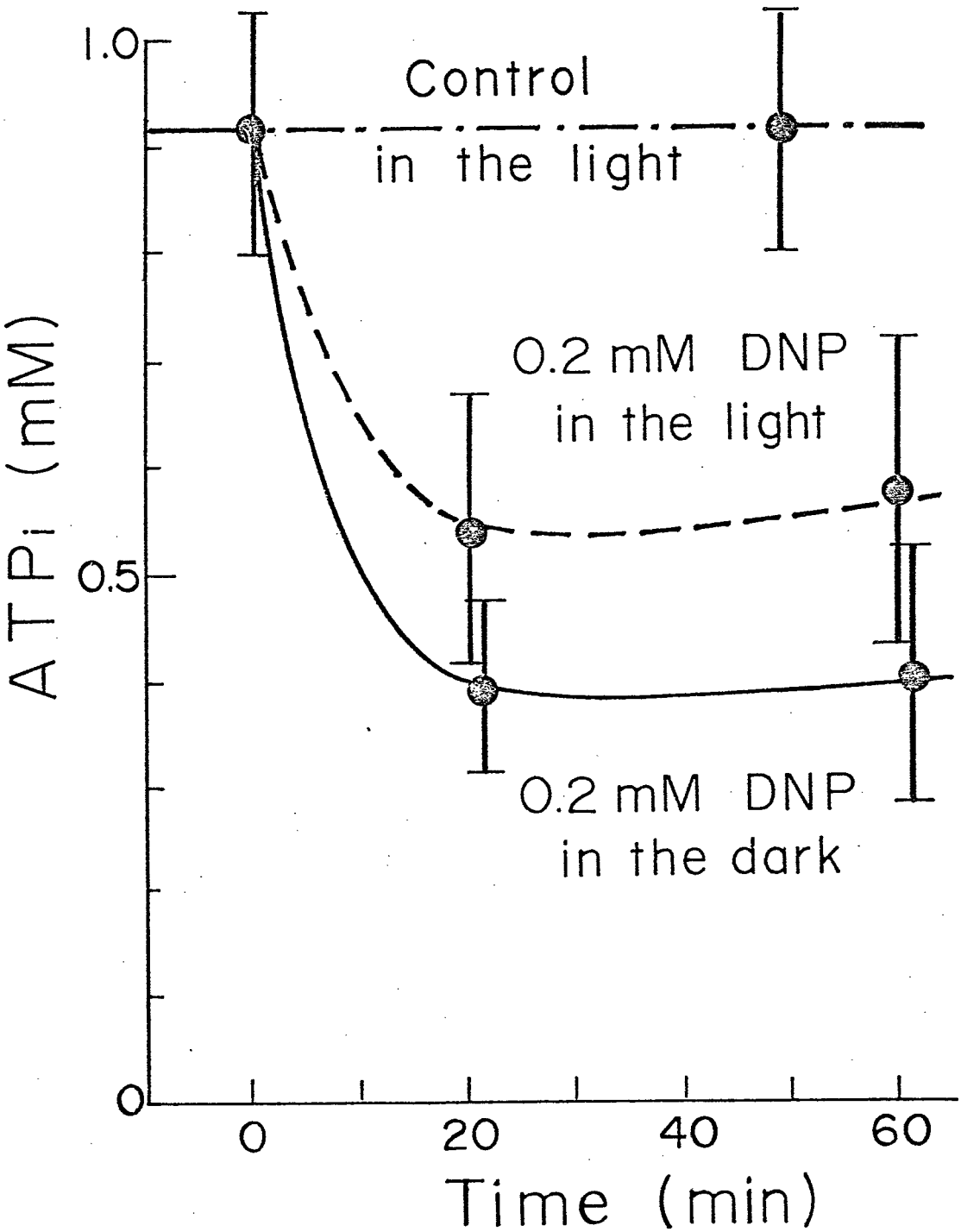


図 4-3　DNP 阻害による細胞内 ATP 濃度の時間変化

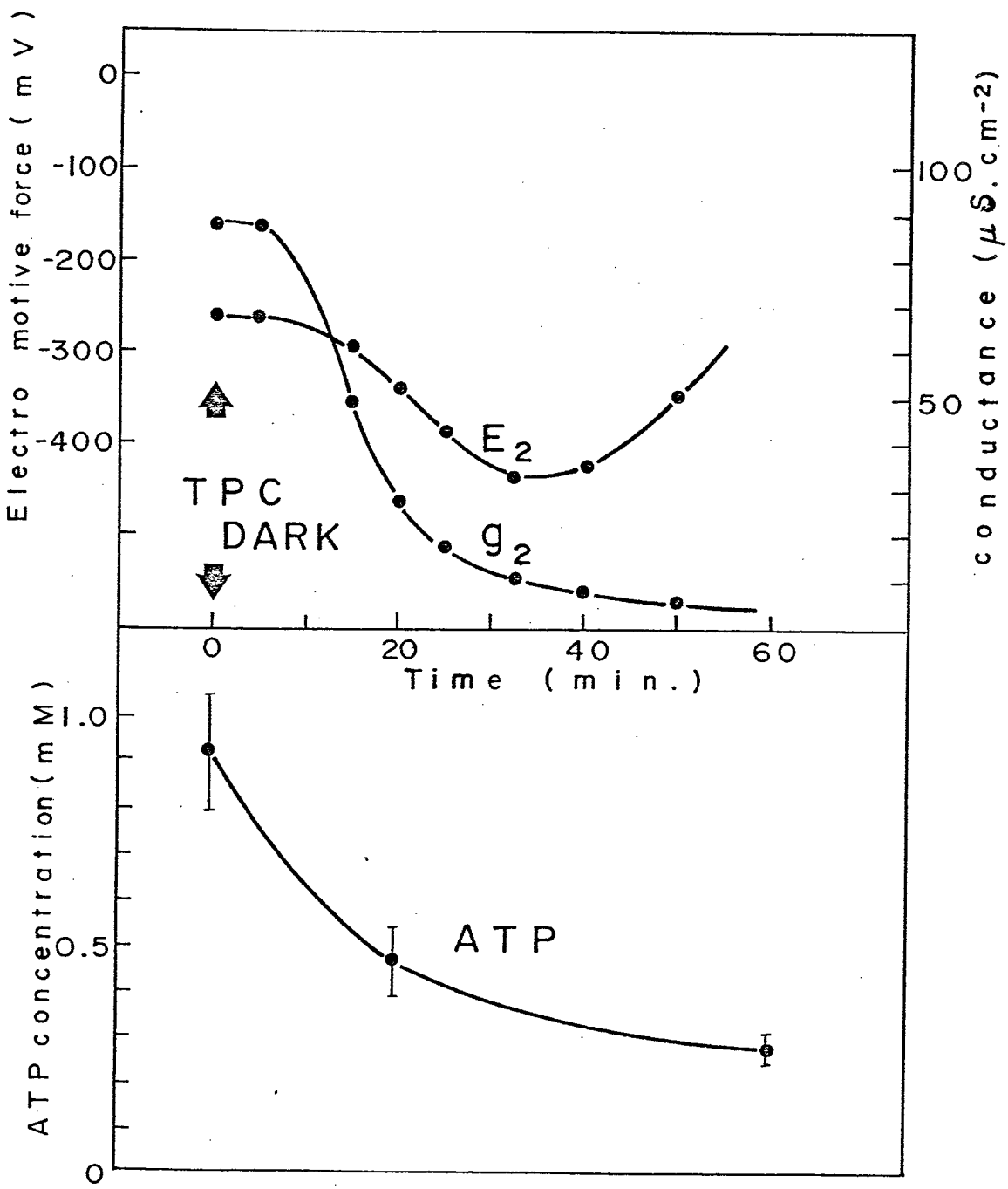


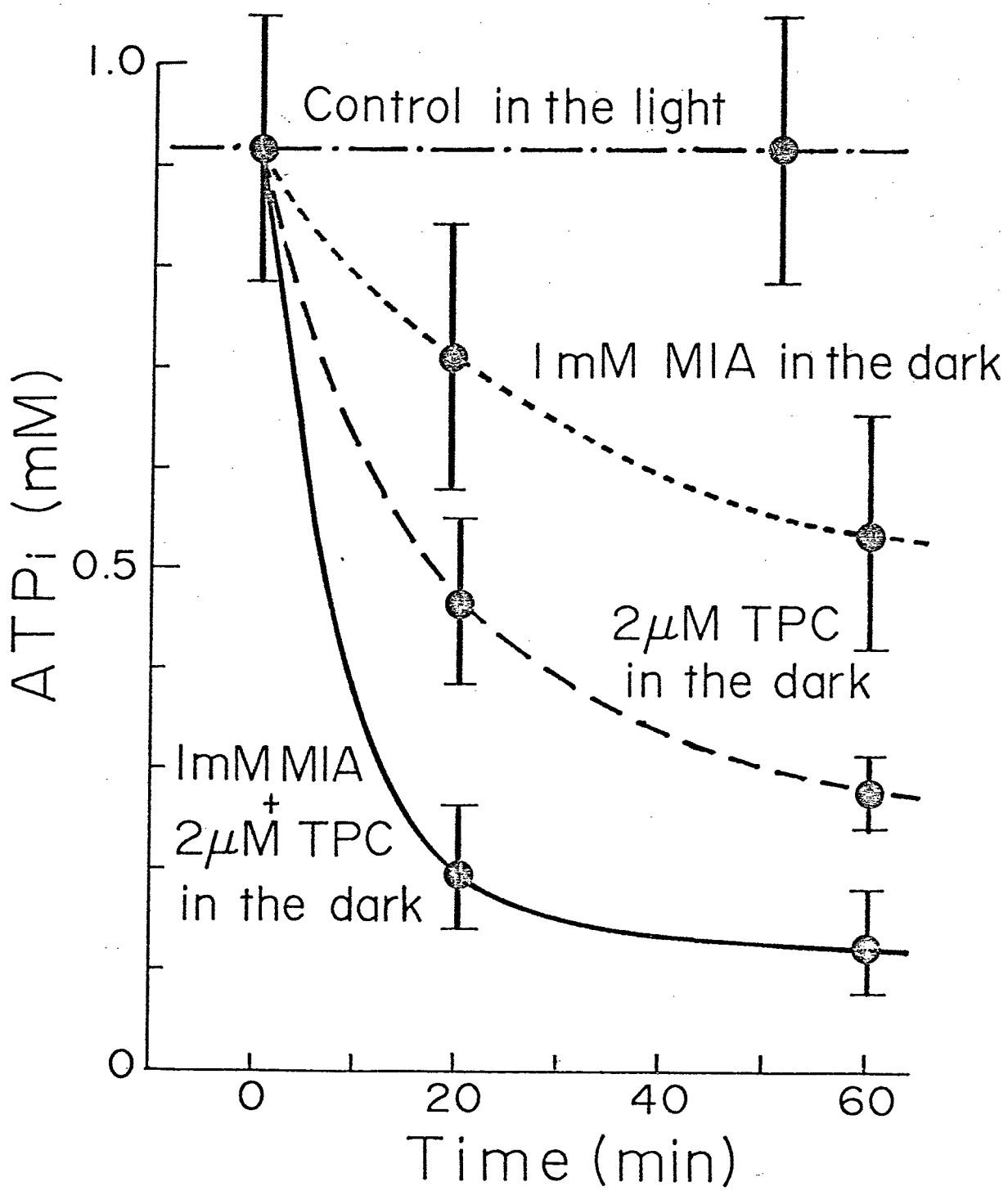
図 4-4　TPC阻害による起電性ポンプ成分の変化と細胞内ATP濃度変化の関係

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＋2μM 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→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分後での残り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。2μM TPCは60分で約30%にまで阻害するが、2μM TPC + 1mM MIAでは約14%までになる（図4-5）。又、1mM MIAでは約58%までしかならない。このデータから、大ざっぱにいえば、ミトコンドリアの酸化的リン酸化で70%が作られ、解糖系で15%作ら

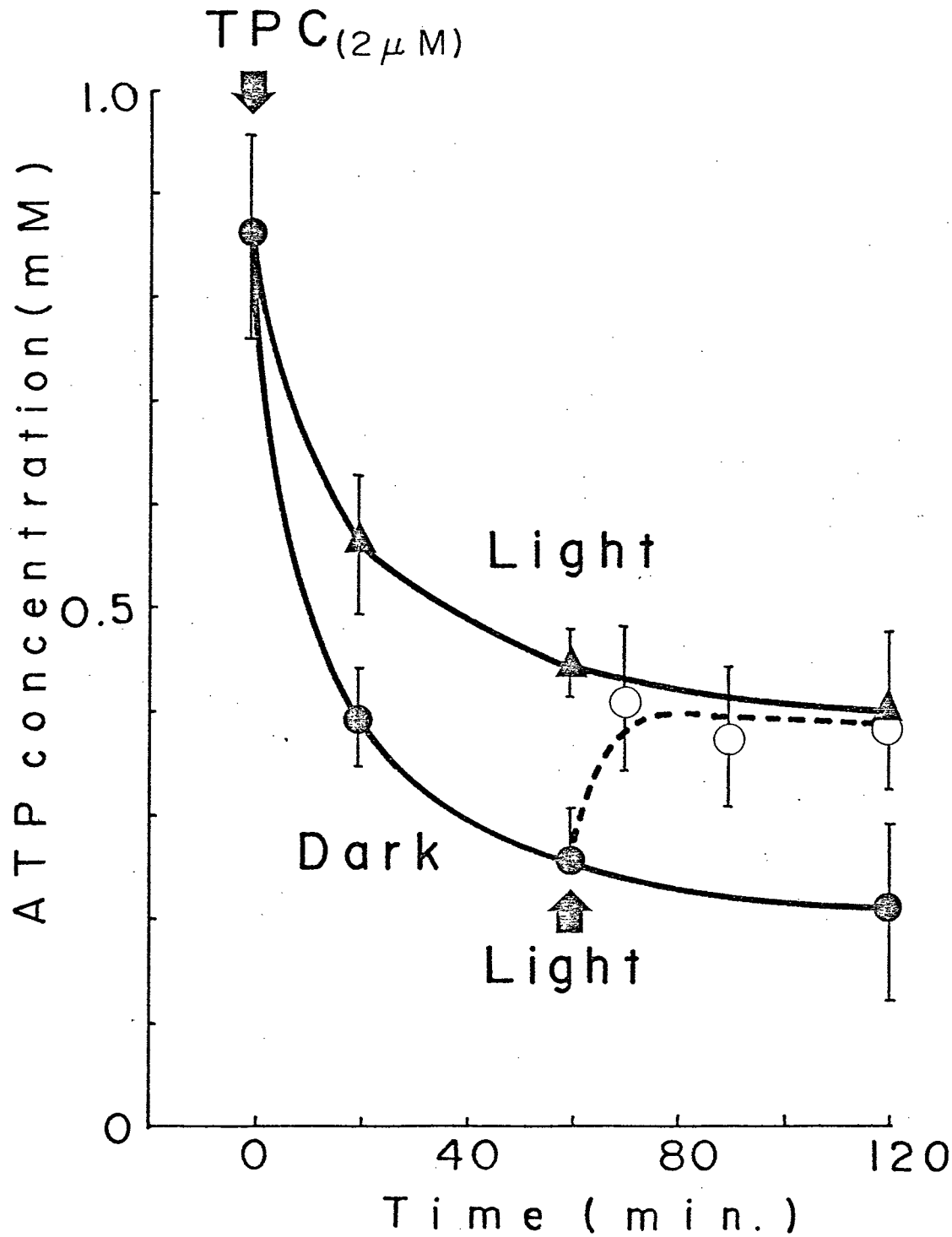


図 4-6　TPC阻害と光条件

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）。g_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いためかもしれない。DNP, TPC阻害の時の明と暗の差は、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。

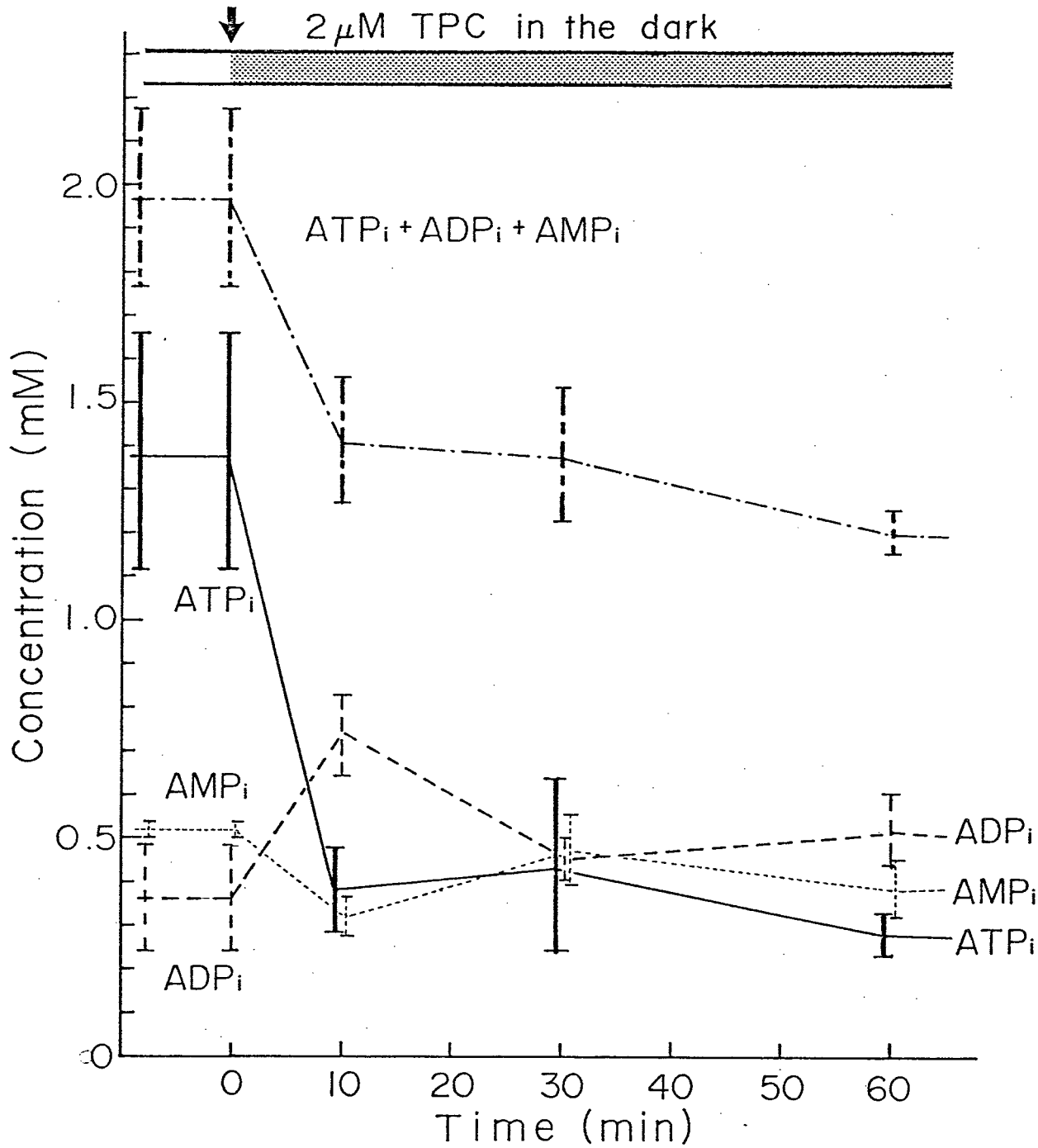


図 4-7　TPC阻害による アデニンヌクレオチド の濃度変化

ATPの加水分解反応の進行にと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の様子を見せる（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わ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）

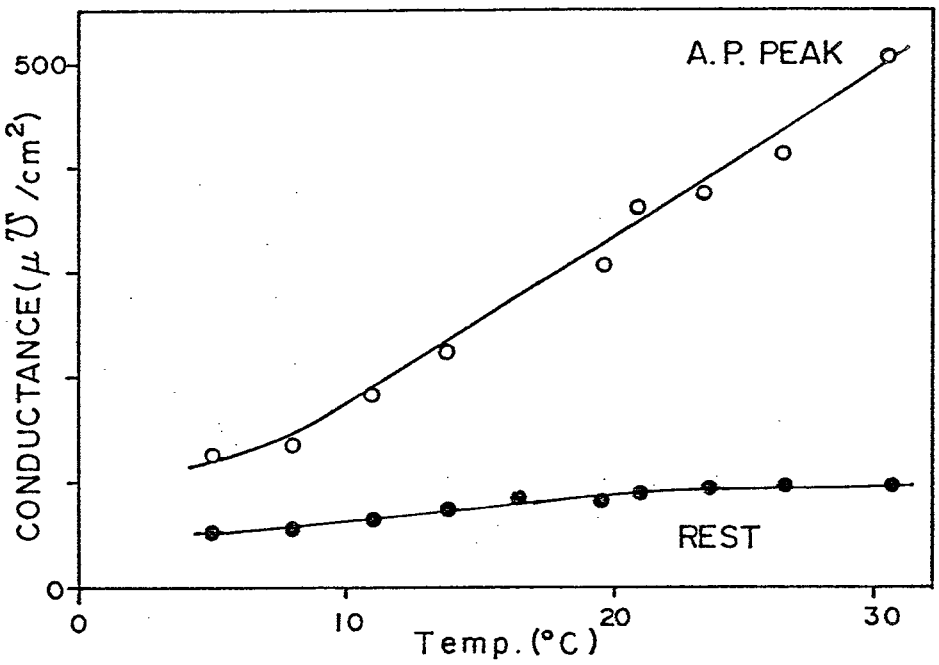
5 温度特性

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、5～30°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50μS/cm² 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



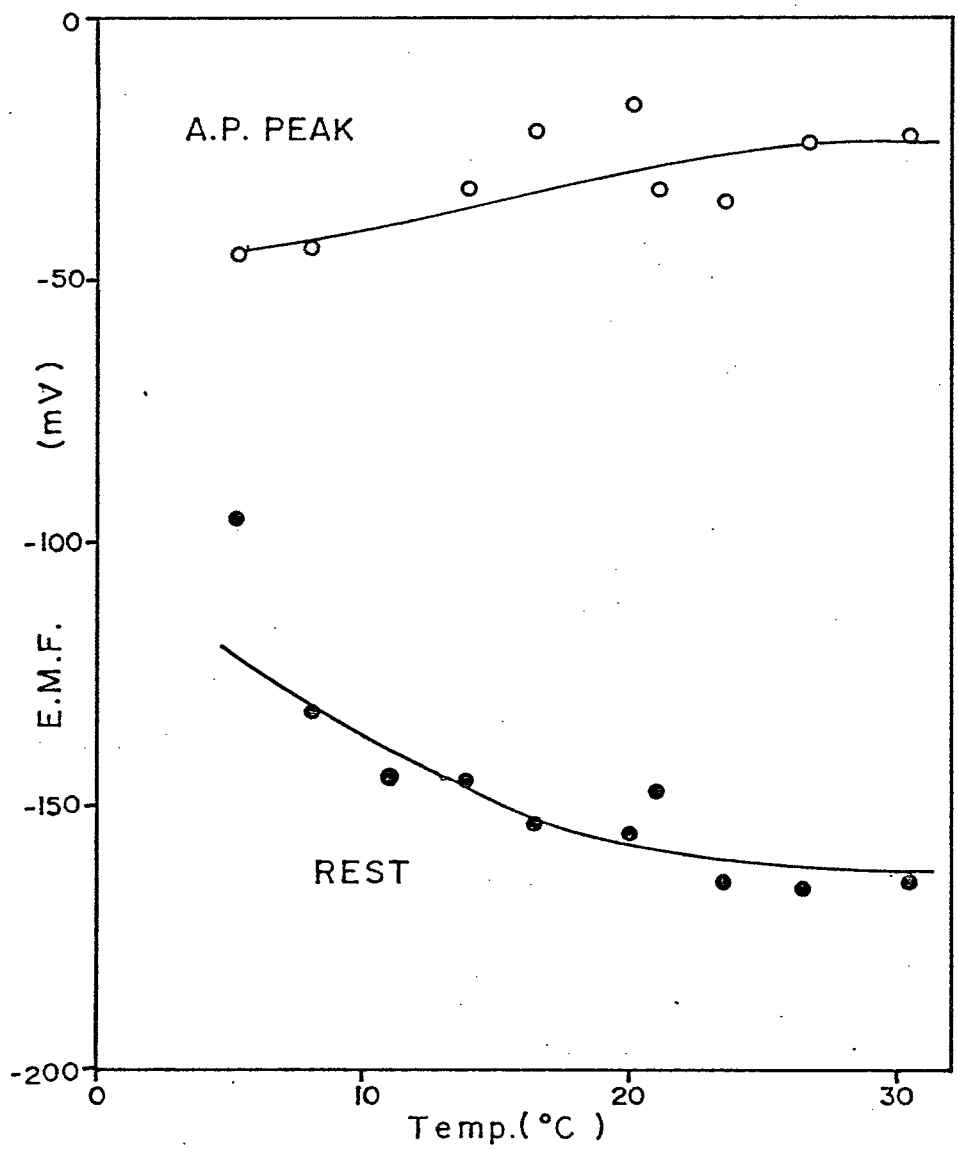


図 5-1　温度と膜起電力

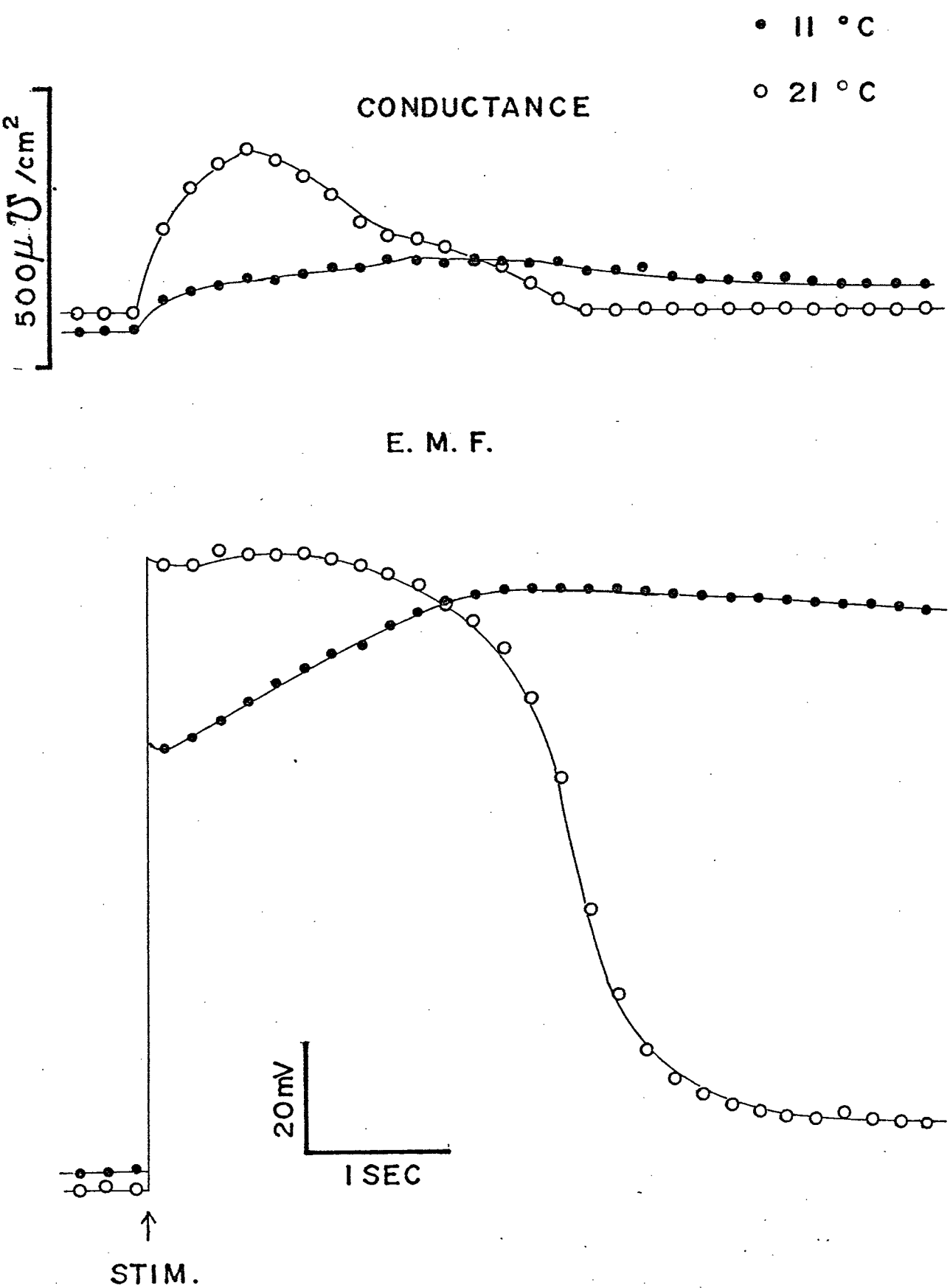


図 5-3　活動電位と温度

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。

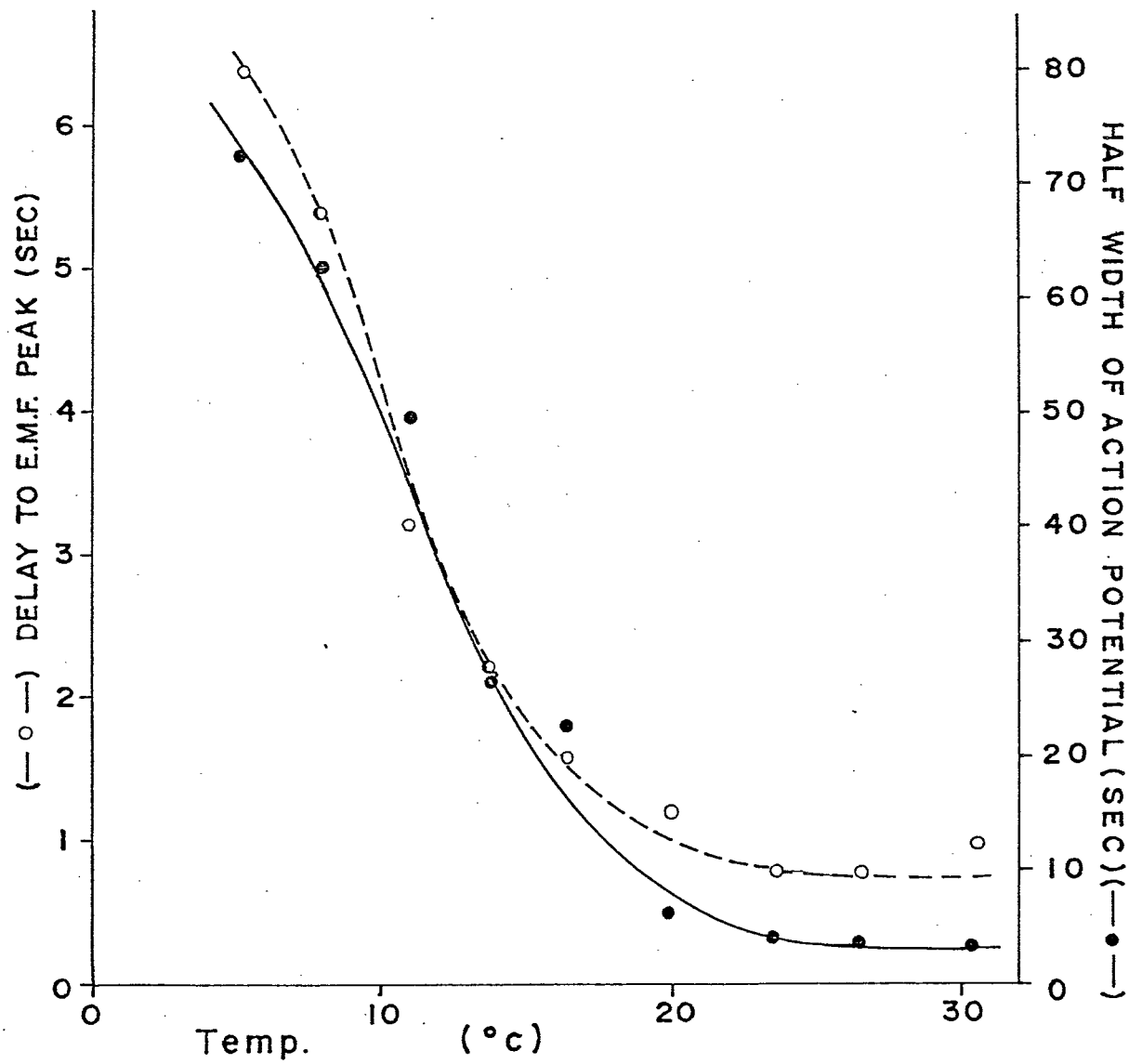


図 5-4　活動電位の巾と電位ピークの温度変化

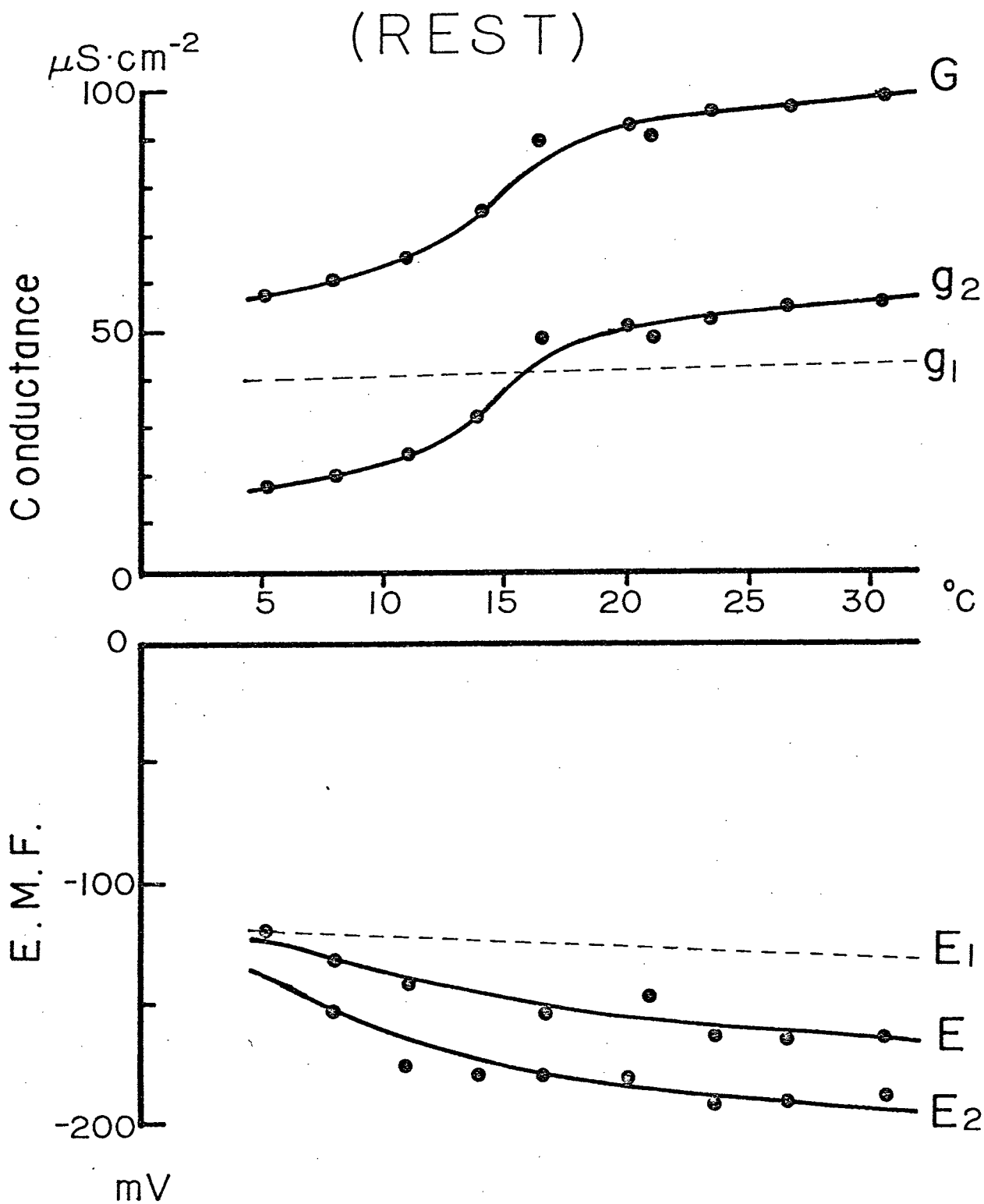
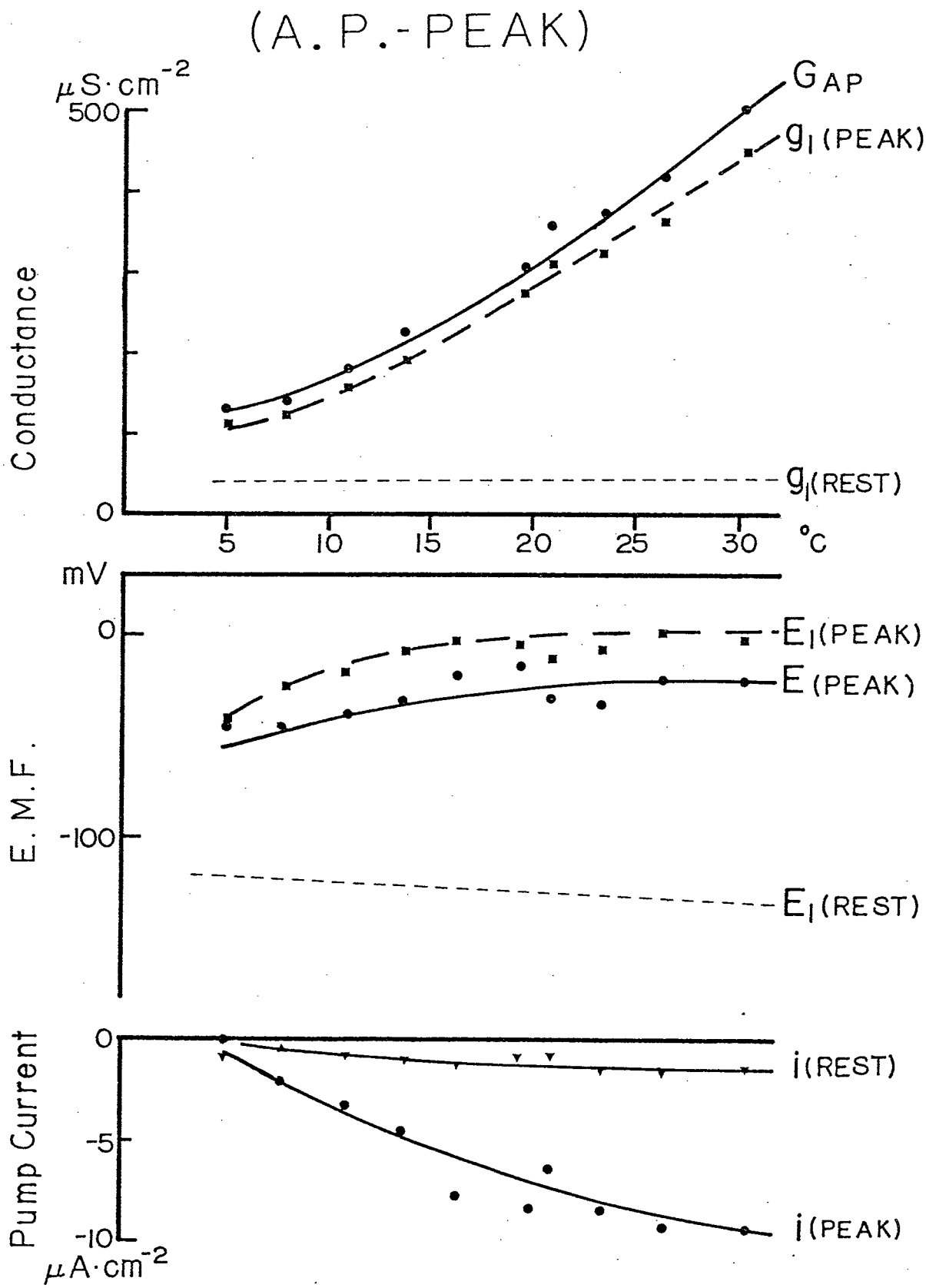


図 5-5　静止時の起電性成分と受動成分の温度特性

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が、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, 40μS/cm² に近づいている。この値は、3章で求めた受動成分の値−100mV, 60μS/cm² 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, 40μS/cm² 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の様になる。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 $Q_{10} \fallingdotseq 2$ 程

度の大きな減少となっている。

以上のことから、温度を変えると大きな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、$Q_{10} \fallingdotseq 2$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ルレ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°C前後で折れ曲っている。活性化エネルギーは、20°C以上で5.86 KJ/mole (1.39kcal/mol)

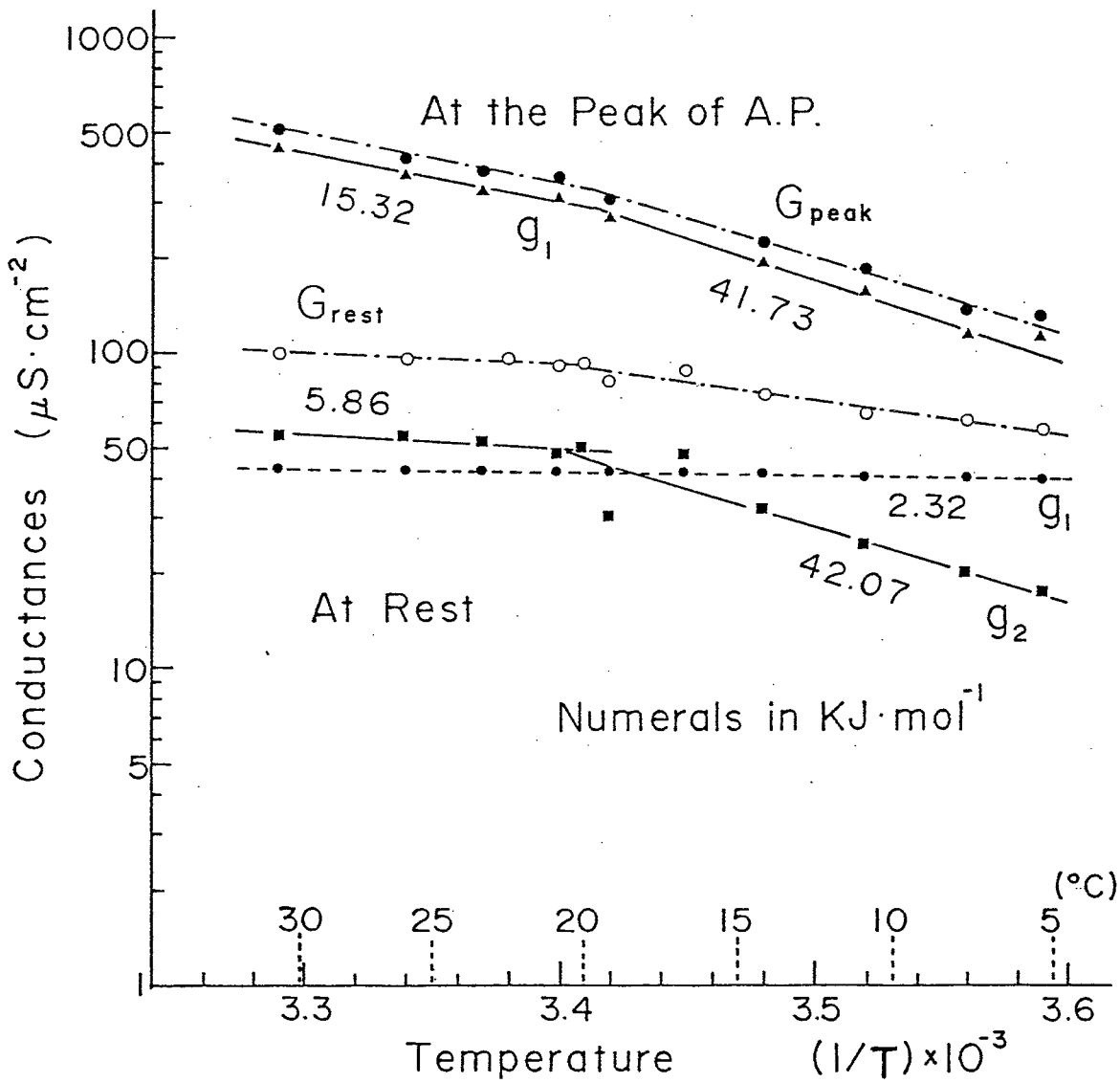


図5-7　静止時と活動電位ピーク時の
コンダクタンスのアルレニウスプロット.

20°C以下で42.07KT/mole(10kcal/mole)、であった。これは、ポンプの機構が少くとも2つの温度特性の異った過程から出来ていることを示している。20°C以下での10kcal/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gNaも又、20°Cで折れている。活性化エネルギーは、20°C以下で、9.9kcal/mole、20°C以上で3.65kcal/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った過程を含んでいることを示している。チャンネルの開閉機構の問題とチャンネルの数(種類)の問題とが、関与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、シャジク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＋2μM 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

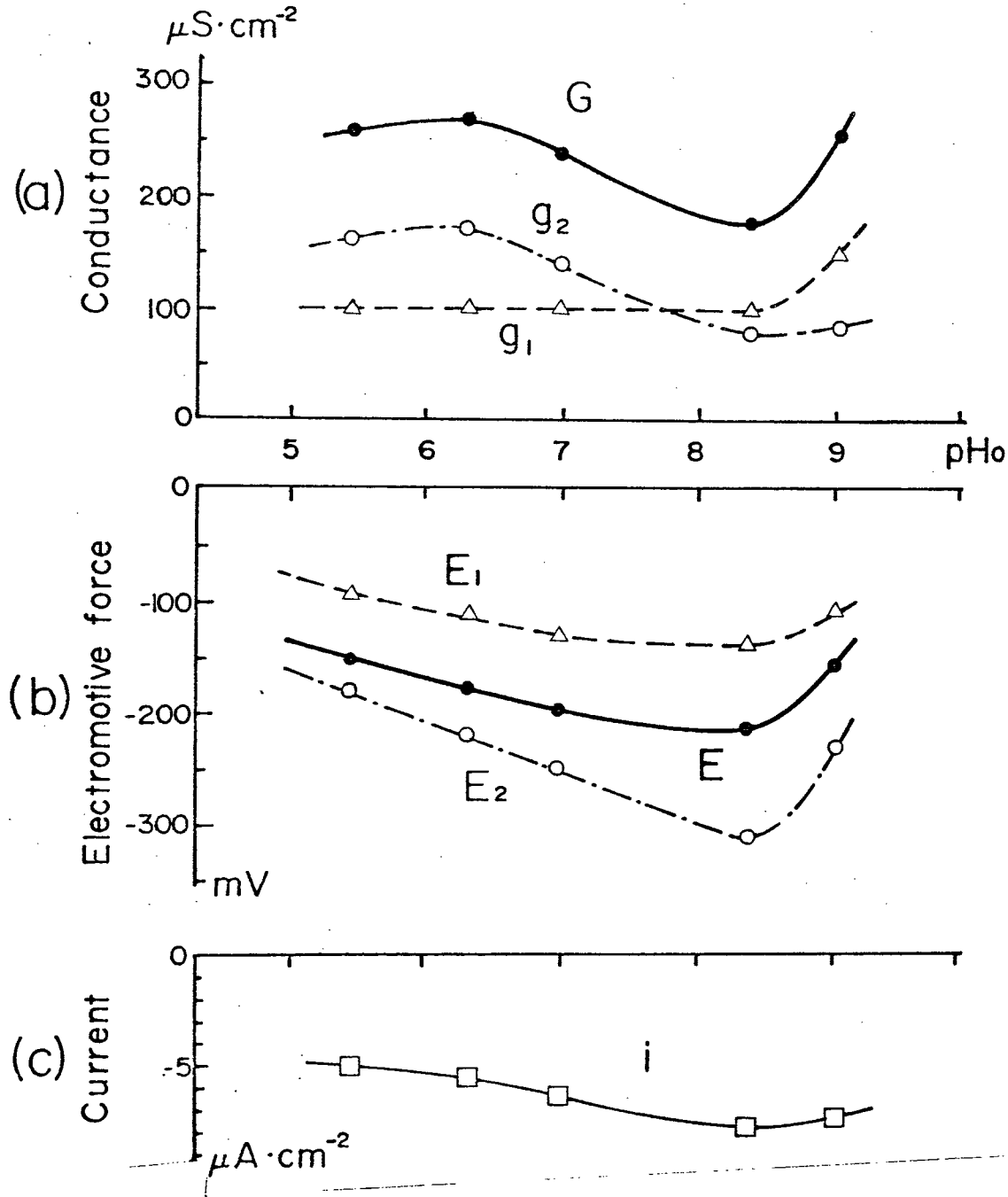


図 6-1　膜パラメータの pH_o 依存性

データから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 pH_o が大きくなるにしたがって過分極し $pH_o = 8.38$ 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 pH_o が大きくなるにしたがって小さくなり $pH_o = 8.38$ で極小となり、再び増大する（255 → 176 → 230 $\mu S/cm^2$）。EのpH依存性を見ると pH_o 5.46 ～ 8.38 では −34 mV/pH_o、pH_o 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 pH_o 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。$pH_o > 9$ に長くおくと、pH_o 7に戻したときに元の値には仲々もどら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_1, g_1は、元のE, GとくらべるとpH依存性が異なる。（図6－1）。E_1のpH依存性は－23mV/pH、g_1については、$pH_o = 5.46 \sim 8.38$であまり変化していない。そこで、g_1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_1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_o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$P_H \gg P_K$でP_H/P_Kは70以上になる。（もっともgHのpH依存性が逆で、ア

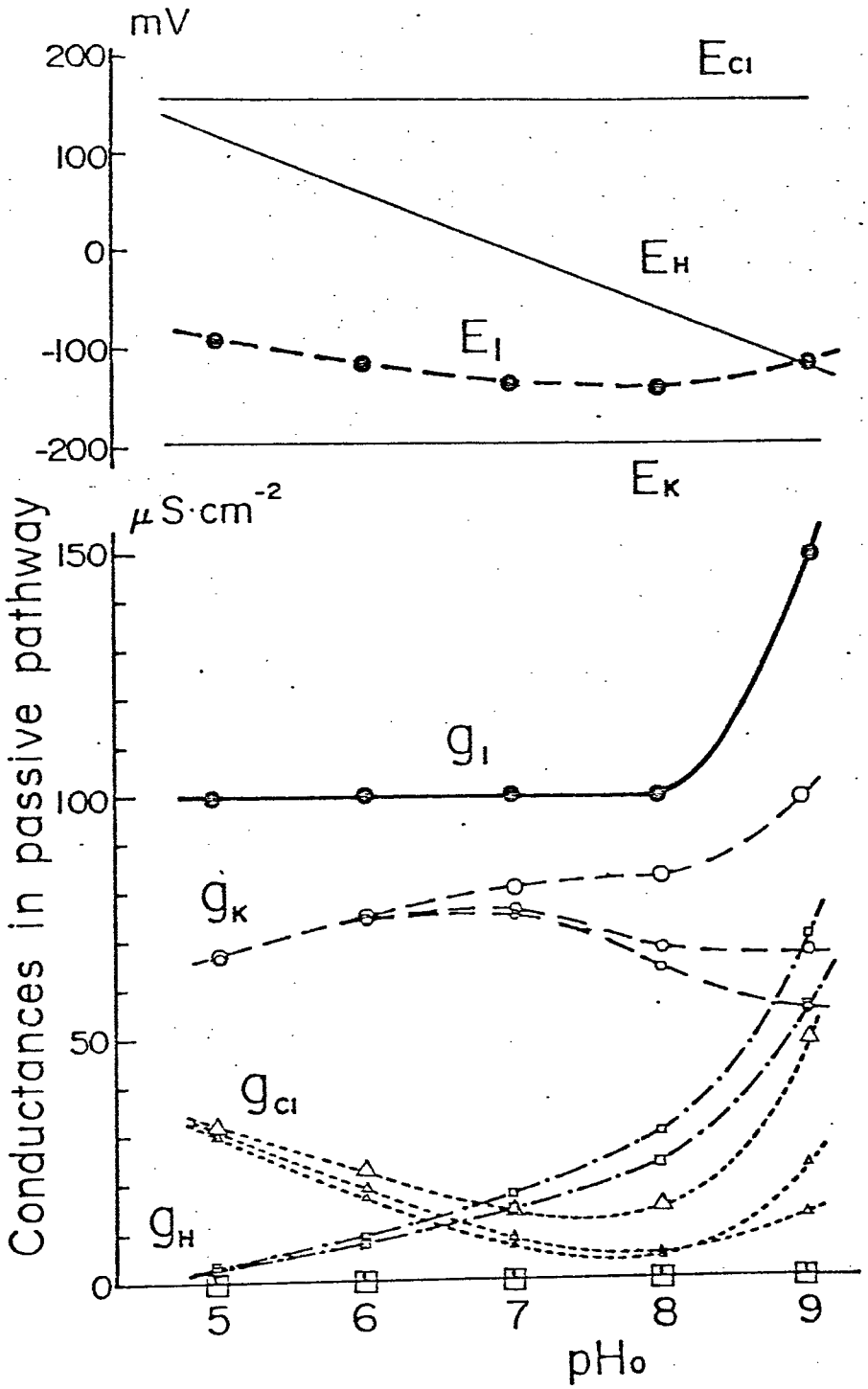


図 6-2　K^+, Cl^-, H^+ チャンネルのコンダクタンスの pH_o 依存性

ロステリック的なことがあるとすれば話は別だが）。受動成分に占めるgH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。gHが大きくないことは、それほどおかしくはない。pH。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。

b）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。5.46～8.38では－49mV/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iもpH。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EH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っ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}；

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

(ΔG°_{ATP} :Standard free energy change)

b) z当量の H^+ を排出する浸透圧的な仕事のエネルギー ΔG_{os} ;

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

c) 膜中の電場を通って、z当量の電荷を外に送り出すのに、必要な電気的仕事のエネルギー ΔG_{el} ;

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

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、負にならなければならない。- 式(1)-(3)より、

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

$[ATP]=1\,mM$, $[ATP]=0.3\,mM$, $[P_i]=0.5\,mM$, $\Delta G^\circ_{ATP}=-7.2$ 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、

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

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

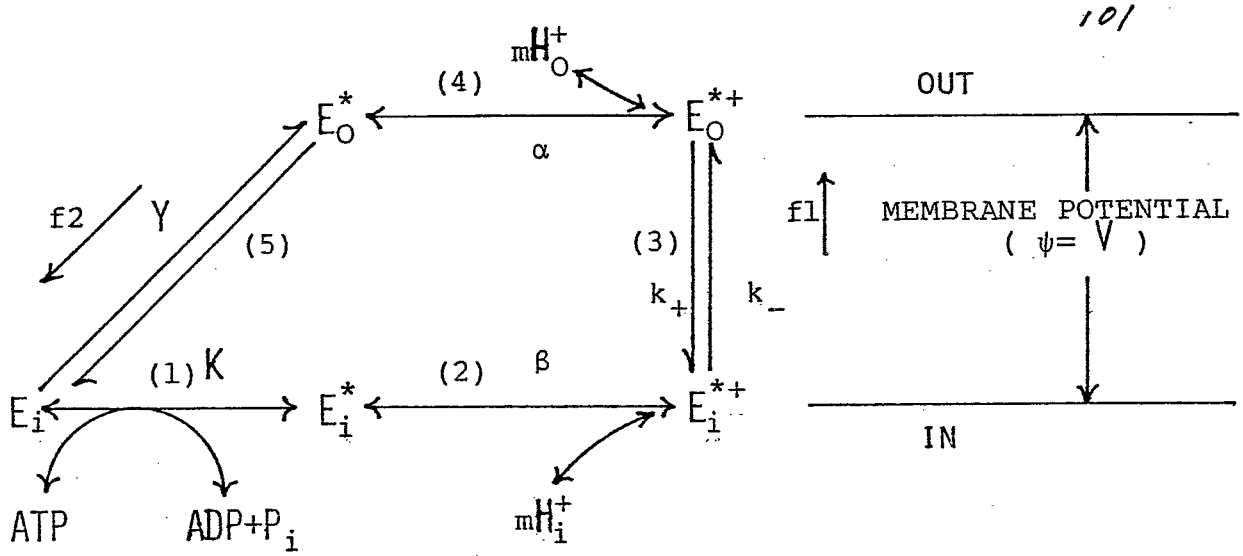
か、2しかない。Mitchellの化学浸透圧説では、z=2としている。又、Slaymanは、アカパンカビの場合ではz=2としている。シャジクモの場合では、1モルのATP加水分解によって、2モルのH^+が排出されると期待される。

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、$\Delta G_{ATP}/2$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

一を、加えたものとなる。故に、ポンプの起電力の最大値 Ep_{max} は、

$$Ep_{max} = -267.5 + 58.16 \cdot \Delta pH \quad (mV) \quad [6]$$
$$(\Delta pH = pH_{in} - pH_{out})$$

となり、$pH_0 = 7$ とすると、$Ep_{max} = -267.5\,mV$。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、$-267.5 - (-200) = -67.5\,mV$ 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、$135\,\mu S/cm^2$ なので、ポンプ電流の最大値は、$-67.5\,mV \times 135\,\mu S/cm^2 = -9.05\,\mu A/cm^2$ となり、図6−1の $-7\,\mu A/cm^2$ と比べると、かなり良い値であると言える。式[6]より、Ep_{max} のpH依存性は、スロープ $-58.16\,mV/pH$ となる。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 Ep_{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



$$(4)\quad E_O^* + m\,H_O^+ \xleftrightarrow{\alpha} E_O^{*+} \qquad [E_O^{*+}] = \alpha [E_O^*][H_O^+]^m$$

$$(2)\quad E_i^* + m\,H_i^+ \xleftrightarrow{\beta} E_i^{*+} \qquad [E_i^{*+}] = \beta [E_i^*][H_i^+]$$

$$(1)\quad E_i + ATP \xleftrightarrow{K} ADP + P_i + E_i^*$$

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

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

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、58mV/pHよりも小さいこと、g_2のpH依存性、E_2とE_{pmax}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_o^*、E_o^{*+}、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_o^{*+}となる。E_o^{*+}は、外側でm個のH⁺をはなしてE_o^*となる。E_o^*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、準平衡状態になっていて、反応のゆきが(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γであるとする。反応のすすみ方としては、E_i^*とE_o^*は、同じエネルギー準位にあり、反応(1),(5)がない時には、Vの値、H_{in}^+, H_{out}^+の濃度によって、(2),(3),(4)は、どちらにでも進む。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。

$$\Delta U = Uo - Ui - mFV \qquad [7]$$

$$(Uo = -RT\ln \alpha,\ Ui = -RT\ln \beta)$$

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。

$$k_- = k\, e^{\frac{Uo-Ui-mFV}{2RT}} \quad [8]$$

$$k_+ = k\, e^{\frac{Uo-Ui-mFV}{2RT}} \quad [9]$$

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、

$$[E_o^{*+}] = \alpha [H_o^+]\ [E_o^*] \quad [12]$$

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

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

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

E_i^{*+}がE_o^{*+}になる正味の量f_1は、

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

[10]～[14]式により、f_1は、[16]式で示され、

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

E_o^*がE_iになる正味の量f_2は、

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

となる。定常状態では、$f_1 = f_2$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。

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

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

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、

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

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

[17]~[19]式より、f_2を求めると、

$$f2=k(\alpha\beta)^{\frac{1}{2}}[E]\,\frac{([H_i^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}}-M[H_o^+]^m e^{-\frac{mFV}{2RT}})}{(1+\alpha[H_i^+]^m)(A[H_o^+]^m e^{\frac{mFV}{2RT}}+M)+(1+M+\beta[H_i^+]^m)(A[H_o^+]^m e^{-\frac{mFV}{2RT}}+1)} \qquad [20]$$

となる。$f_2=0$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Epとなる。

[20]式より、

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

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

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

(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、

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

となる。そこで、

$$Ep=\frac{RT}{F}\left(\ln K_{ATP}-\ln\frac{[ATP]}{[ADP][Pi]}\right) \qquad [22]$$

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

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

とおくと、[21]式は、

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

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。[23]式のE_Hは、H^+の平衡電位である。[25]式は、ATPによる駆動力が、m個のH^+輸送に、均等に使われ、

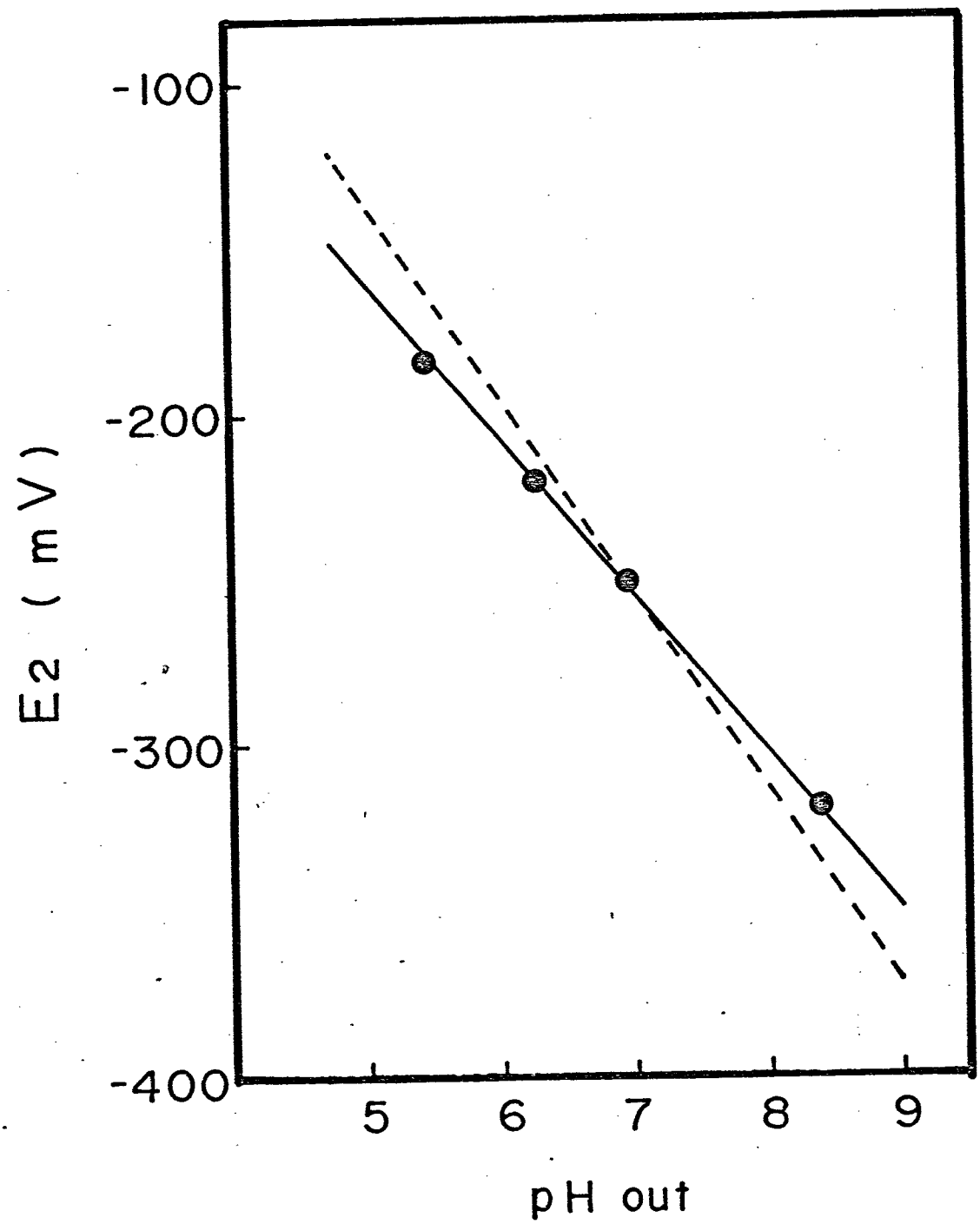


図6-4　E_2 の pH_o 依存性

(● : 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(−58mV/pH)である(20°C)。図6−1から、pH_o=6.96の時の、E_2=−253.6mV, m=2で計算すると、E_R=13.9mV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、−49mV/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(1)で、消費される分がE_Rに相等することを示している。

ポンプ電流I_pは、f_1にE_o^{*+}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。

$$Ip = mFfl \qquad [26]$$

[20]式を、簡略化して、Ipを表現すると、

$$Ip \propto \frac{e^{\frac{mFV}{2RT}}\left(1-e^{\frac{mF(Ep-V)}{RT}}\right)}{e^{\frac{mFV}{2RT}}+K1\,e^{\frac{mFV}{2RT}}+K2} \qquad [27]$$

(K_1, K_2は定数)

となる。そこで、Ep=−253.6 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、Ip−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、かけはなれていないと考えられる。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、Epと0mVの間で定電流源として働く場合はない。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

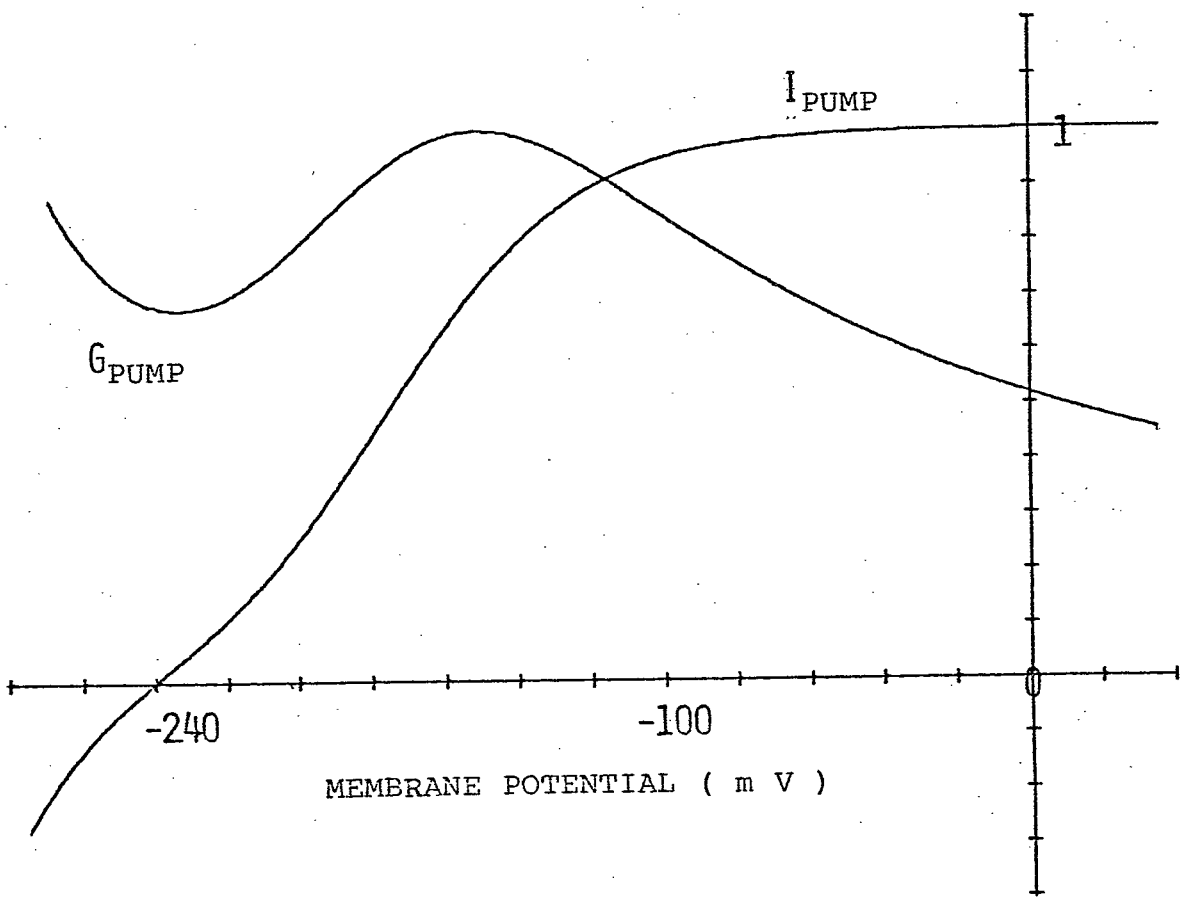


図 6-5　H^+ ポンプの反応モデルの解の一例.

($K_1 = 10^{-10}$, $K_2 = 10^{-3}$
G_{pump} はコードコンダクタンス)

ビなどの、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]=[Pi]=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^+しか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、ポンプがかなり阻害されて、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にしかなっていないので、阻害を、ATP濃度減少

だけで説明するのはむつかしい。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)もっと起電力の大きな、別の起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を下げても、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_1, g_1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を考えると説明できる。

H^+ポンプの反応モデルと、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の起電力E_{pi}は、

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

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つのポンプが並列に並らんでいて、2種のポンプのコンダクタンスをg_{pH}, g_{pi}とすると、

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

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

[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のデータのスロープは-49mV/pHだから、

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

$g_{pH}/g_2 = 0.84$ となる。ポンプのコンダクタンスの16%は、2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、2番目のポンプのイオン種は、Cl^- と思われる。i種を Cl^- にして、E_{pi} を求めてみると、$E_{pCl} = -38.2mV$, $E_{RCl} = 40.7mV$ 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)。シャジクモでは、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^- を内に輸送する。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。

$$Eco = \frac{2RT}{F} \ln \frac{[H_i^+]}{[H_o^+]} + \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl_o^-]}{[Cl_i^-]} + E_x \qquad [31]$$

(E_x: 反応定数の項)

[3]式で興味深いのは、Cl^-が一見カチオン的に働くことと、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の成分の中に組込もうとすると、H^+ポンプと相互作用のある様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、可能性のとりこぼしがないと考えると、H^+ポンプ以外に、別のポンプ(Cl^-かどうか判らないが)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。共輸送は、むしろ、E_1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ち、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_o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って、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、Ca^{++}, 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。

欧文引用文献

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 curcuit of the Acetabraria 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 reactionkinetic 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 bresk 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に感謝いたします。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。