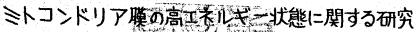
T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報 Article / Book Information

題目(和文)	ミトコンドリア膜の高エネルギー状態に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	広瀬茂久
Author(English)	SHIGEHISA HIROSE
出典(和文)	学位:理学博士, 学位授与機関:東京工業大学大学院理工学研究科, 報告番号:甲第729号, 授与年月日:1975年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Science, Conferring organization: , Report number:甲第729号, Conferred date:1975/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
 学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis





D 2022. 広瀬茂久

指導教官 稲田祐二助教授

I
I -
I - 2 ミ トコンドリア研究の歴史 1 4 2 1 - 3 酸化的リン酸化 2 1 - 4 ミ トコンドリアの構造と機能 1 - 5 酸化的リン酸化の機序 5 5 I - 6 本論文の主旨 17 17 17 17 17 18 17 18 17 18 18
I - 3 酸化的リン酸化
I - 4 ミトコンドリアの構造と機能 1 - 5 酸化的リン酸化の機序 5 1 - 6 本論文の注旨 1 - 6 本論文の注旨 1 - 6 本論文の注旨 1 - 7 1 限イオン性色素によるミトコンドリア膜内電荷の探索がよび除其役割, 1 - 1 1 1 1 1 1 1 1 1
I - 5 酸化的リン酸化の機序 1 1 1 1 1 1 1 1 1
I - 6 本論文の注旨
II - 1 序
II-2 実験方法
1 1 2 - 3 p 変化の測定法
111-13-12 ピナシアリールとミトコンドリアの相互作用 17

andra (1 de mario de combinado de mario de mari Combinado de mario d
[1 1 3 - 3 CCCP のミトコンドリアに対する作用機作
[[]]- 4 考察 [] [] [] [] [] [] [] [
.
Ⅲ 化学修飾法によるミトコンドリア膜の高エネルギー状態の探索 ┃ ┃
[/ _ 序
」 四-2-1 アクロレインにはる修飾
[10 3 結果
10-3-11 アクロレインによる修飾
1 1 1 1 2 ダンツルクロライドによるミトコンドリアの移像
[]] [] [定量
1 1 4 - 2 ミトコンドリアのダンシル化 48
·[M] 漢省
▼ 引用文献

Abbreviations (本論文で用いる略号)

```
Adenine nucleotide
AdN
ADP
          Adenosine diphosphate
AMP
          Adenosine monophosphate
          1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid
ANS
As
          Arsenate
ATP
          Adenosine triphosphate
          Adenosine triphosphatase
ATPase
BPB
          Bromophenol blue
BSA
          Bovine serum albumin
BTB
          Bromothymol blue
CCCP
          Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CD
          Circular dichroism
          Cytochrome c side of the mitochondrial inner membrane
C-side
Cyt
          Cytochrome
DCCD
          Dicyclohexylcarbodiimide
          \underline{N}, \underline{N}-dibenzyl-\underline{N}, \underline{N}-dimethylammonium cation
DDA+
DNP
          2,4-Dinitrophenol
DNS-C1
          Dansyl chloride; 1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl
                             chloride
DTNB
          5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA
          Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA
          Glycoletherdiamine-\underline{N}, \underline{N}, \underline{N}-tetraacetic acid
\mathbf{F}_{1}
          Mitochondrial ATPase
FCCP
          Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
          Non-heme iron protein
FeS
          Fluorescamine-treated phosphatidylethanolamine
Flu-PE
FMN
          Flavin mononucleotide
8-HB
          β-Hydroxybutyrate
HEPES
          N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
          Inner membrane
IM
MNS
          2-(N-methylanilino)naphthalene-6-sulfonate
M-side
          Matrix side
Mt.
          Mitochondria
NAD
          Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH
          Reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NEM
          N-Ethylmaleimide
NMR
          Nuclear magnetic resonance
OM
          Outer membrane
ORD
          Optical rotatory dispersion
PCB
          Phenyldicarbaundecaborane anion
PCP
          Pentachlorophenol
Ρi
          Inorganic orthophosphate
Prot
          Protein
          Coenzyme Q
QM-BSA
          Quinacrine mustard-bovine serum albumin complex
R^{\Phi}
          Lipid-soluble cation (such as rhodamine 6G, TBA and pinacyanol)
Rho.6G
          Rhodamine 6G
SDS
          Sodium dodecyl sulfate (or Laurylsulfonate)
Succ
          Succinate
TBA+
          Tetrabutylammonium cation
TMPD
          Tetramethyl p-phenylenediamine
          Trinitrobenzene sulfonate
TNBS
MNT
          Tetranitromethane
TNP.
          Trinitrophenol
TNS-
          2-p-Toluidinonaphthalene-6-sulfonate
TPAC
          Tetraphenylarsonium chloride
TPB-
          Tetraphenylboron
TPMP+
          Triphenyl methyl phosphonium cation
Tris
          Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
          Valinomycin (cf. Val; Valine)
val
X \sim Y
          High energy state of the mitochondrial membrane (~) Protonated form of uncoupler(\phi^-)
\phiH
⊿H+
          Proton gradient
<sup>⊿A</sup>526
          Absorbance change at 526 nanometer (nm)
F<sub>557</sub>
          Relative fluorescence intensity at 557 nm
```

				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
[] [] 序論				
	胞呼吸研究の歴史	(1-3]		
細胞が生命の維	持に必要なエネル	ギーまどのよう	な機構で獲得	している
かは古くから人類が抱				1 1 1 1 1 1 1
大きな課題のリッとさ			and the second s	
物に酸素がス可欠であ				
たのは19世紀末であ				-
Euler, Schlenk (194	•			and the second s
構造決定あよびその作		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
レオチドとフラビン酸			The State of the S	
□□□ピリジンヌクレ □□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□			1	and the second second
らかにされるとともに				
素カルボン酸が呼吸作				
よるクエン酸サイクル				
	の母代は生体酸化			
に伴って遊離されるエ	ネルギーかどのよ	うな形でどのよ	うた利用され	るかにあ
ロではあまり注意が私	かれなかった。A	TP 自体は Loh	man 1= to	7 1937
毎に発見されていたが	細胞内エネルギー	変換における A	TP の重要性	が認識さ
れたのは後のことで、	1937年に至って	H L' DIT Kalcke	アが「呼吸に	# , 《 數
瞥き水と炭酸がスまで				at a state of the
という形で貯える」と				
Belitzer & Tzibokova				and the second
では呼吸酵素系が細胞		ような形で存在	するかについ	
とんど注意が払かれな				
	トロンドリア研究		<u> </u>	
一一一大下のような細	胞呼吸の性理化学	的なの形とは雅		ン ド リ <u> ア </u> で数
				37
				¥.
				aga IF

は Kölliker らによって 1850 年代に細胞内顆粒としてはじめて記載された。その後 Altman (1890), Benda (1898)らによってミトコンドリアに特異的な深色法が見い出され、組織化学的な研究が発展しミトコンドリアはリン脂質とタンパク質を含み (Regaud, 1908), 細胞内酸化の部位である可能性が示唆された (Kingsburg, 1912)。さらに 1914年, Lewis らけミトコンドリアの形態が細胞内の代謝と密接に関連して1113にとま示した。

リアの役割の全貌が明らかにされた。すな めち、ミトロンドリアはクエン酸サイクル、 脂肪酸酸化、酸化的リン酸化に関与するす べての酵素を含み、細胞の *エネルギー産 生工場 * であることが明らかになった。

エー3、酸化的リン酸化*

| 生体内に取り入れられたエネルギー 源としての炭水化物、脂肪酸、アミリ酸は 最終的にクエン酸サイクルに入って脱炭酸 脱水素される。脱水素された水素は大部分 NADH の形で呼吸鎖にわたされ、最終的 な酸化剤である酸素と結合する。この過程 は発エルゴン的であり、生体はエネルギー

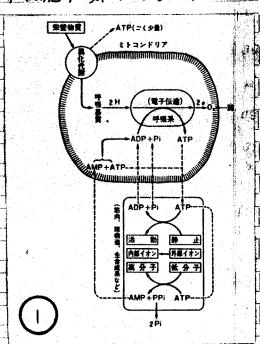


Fig.1. Energy cycle of animal cells. ATP, the common carrier of energy, is formed in the mitochondria.

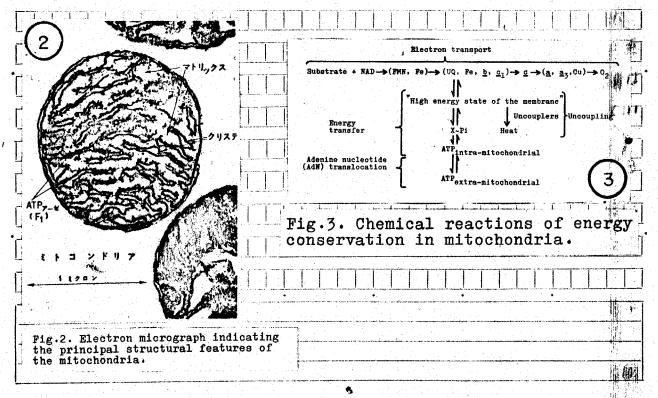
落差を利用してATP を合成し自由エネルギーを保存する。これらすべての反応は細胞内の一顆粒であるミトロンドリア内で起こるもので、呼吸鎖(電子伝

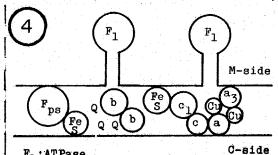
* oxidative phosphorylation

3

連系ともいう)での電子伝達に共役した ATP の合成反応を酸化的リン酸化と呼んでいる。以上のような細胞呼吸(生体エネルギー変換)の基本的な概念および知見は、1950年までにほぼ確立した。その後ミトコンドリアの構造的基盤は電子顕微鏡を用いた微細構造の観察によって明らかにされる一方、生化学的分離法(1クロマトグラフィー、超遠心分離法など)、分析法(分光学的方法、電気泳動法、免疫学的方法など)の進歩に伴ってミトコンドリア構成成分とその順内における存在場所および機能に関する知見の集積と体系化が進めらい、可でに多くの総能[6+15,25]] や成書[1,3,16-24] まみる仕至っているが、ミトロンドリアの最も重要な機能である酸化的リン酸化の機構は大石には、きりせず、その分子レベルでの解明が大きな問題として残されている。

・1-4. ミトコンドリアの構造と機能





F₁:ATPase

Fps:Succinate dehydrogenase FeS:Non-heme iron protein

:Coenzyme Q, a:Cytochrome a :Cytochrome b, c:Cytochrome c

Fig.4. Anisotropic binary arrangement of protein subunits in mitochondrial cristae.

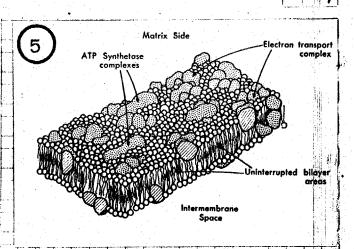


Fig.5. Tentative topography of inner mitochondrial membrane.

素の多くは内膜にあける存在部位が明らかにされている(図4)。例えば、チ トクロムCは内膜の外側表面付近に、チトクロム Q, Q3 は両側にまたがって また下、と呼ばれる ATPase はマトリックス側表面に存在すると考えられてお り[25], Hessenden-Raden [26] および Racker [14], Packer [27,图5] らによって内膜の模式図が提出されている。また電子伝達系とエネルギー転移

電子伝達系の阻害剤

ミトコンドリアの電子伝達系およびエネルギ 系と阻害剤の阻害部位

Fig.6. The sites of action of inhibitors

系の要素にはそれぞれ固有な阻害剤(図 6)が知られており反応の解析に用いら れる。阻害剤は図6に示した3つのリン 酸化部位(エ、エ、四)の決定にも大きな 役割を果した。これら電子伝達系の阻害 削およびエネルギー転移系の阻害剤の他 にアンカップラーと呼ばれる一連の除共

役削 すなめち雷子伝達系とエネルギー

転移系との間を橋内たししている過程に

作用し共役(coupling)を解除する物質が知られており、エネルギー共役機構 上の関連でその作用機作が注目されている。

|分子量が非常に大きくない限り||大部分の物質はミトコンドリアの外膜 を自由に透過できるが、内膜は H+, K+, Na+, CE ははじめ NAD, ADP, ATP

M-side; matrix side

C-side; cytochrome c side

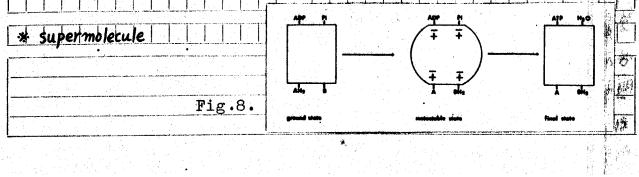
D-Hov-L-Val-1-lac- D-Val-D-Hov-L-Val

(MW. 1111)

Hov; a-Hydroxy-isovaletic acid

Val; Valine

在精力的な検討が加えられている。以下にその概略を示す。 (1) 化学共役説(chemical coupling hypothesis) 本仮説は Slater(1953、[36])によって提唱されたもので電子伝達が高エネルギー中間体を性成するとするものであり、Grevilleの総説〔37〕にみられるようにミトコンドリアにあけるほとんどすべてのエネルギー共役を説明することができるが、最大の弱点は多くの試みにもかかわらず、仮説の中心をかす高エネルギー中間体の存在が奥証されないことである。しかし、今後この高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的なモデルンステムによるATPの合成実験より川くつかの中間体モデル[38+40]4リ、245〕が提起され、その可能性も検討されている。 (2) コンボメージョン説(conformational coupling hypothesis) 新肉はATPの水解によって遊離したエネルギーを機械的な仕事に変換
本仮説は Slater (1953, [36])によって提唱されたもので電子伝達が高エネルギー中間体を生成するとするものであり、Grevilleの総説[37]にみりまるようにミトコンドリアにおけるほとんどすべてのエネルギー共役を説明することができるが、最大の弱点は多くの試みにもかかわらず、仮説の中心を対す高エネルギー中間体の存在が実証されないことである。しかし、今後この高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的なモデルリステムによる ATP の合成実験より川くつかの中間体モデル [38+40]41、245]が提起され、その可能性も検討されている。
高エネルギー中間体を生成するとするものであり、Grevilleの総説〔37〕にみ られるようにミトコンドリアにおけるほとんどすべてのエネルギー共役を説明 することができるが、最大の弱点は多くの試みにもかかからず、仮説の中心を なす高エネルギー中間体の存在が実証されないことである。しかし、今後この 高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的な モデルンステムによる ATP の合成実験より川くつかの中間体モデル〔38-40〕 41、245〕が提起され、その可能性も検討されている。
「5州るようにミトコンドリアにおけるほとんどすべてのエネルギー共役を説明」することができるが、最大の弱点は多くの試みにもかかわらず、仮説の中心を なす高エネルギー中間体の存在が実証されないことである。しかし、今後この 高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的な モデルンステムによる ATP の合成実験よりリくつかの中間体モデル [38+40] 41, 245] が提起され、その可能性も検討されている。
することができるが、最大の弱点は多くの試みにもかかからず、仮説の中心を なす高エネルギー中間体の存在が奥証されないことである。しかし、今後この 高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的な モデルンステムによる ATP の合成 実験より 11く つかの中間体モデル [38+40] 41, 245] が提起され、その可能性も検討されて11る。 「(2) コンホメーション説(conformational coupling hypothesis)
なす高エネルギー中間体の存在が実証されないことである。しかし、今後この 高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的な モデルンステムによる ATP の合成実験よりいくつかの中間体モデル [38+40] 41、245〕が提起され、その可能性も検討されている。 「(2) コンホメーツョン説(conformational coupling hypothesis)
なす高エネルギー中間体の存在が実証されないことである。しかし、今後この 高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的な モデルンステムによる ATP の合成実験よりいくつかの中間体モデル [38+40] 41、245〕が提起され、その可能性も検討されている。 「(2) コンホメーツョン説(conformational coupling hypothesis)
高エネルギー中間体が発見される可能性は依然として存在する。有機化学的な モデルンステムによる ATP の合成 実験より川くつかの中間体モデル [38-40] 41, 245〕が提起され、その可能性も検討されて川る。 [1] (2) コンホメーツョン説 (conformational coupling hypothesis)
モデルンステムによる ATP の合成 実験より II くっかの中間体モデル [38+40, 41, 245] が提起され、その可能性も検討されて II る。 [41, 245] が提起され、その可能性も検討されて II る。 [1] (2) コンホメーション説 (conformational coupling hypothesis)
41, 245]が提起され、その可能性も検討されて113。 [1] (2) コンホメーション説(conformational coupling hypothesis)
[[(2) コンホメーツョン説 (conformational coupling hypothesis)]
している。これと類似した、しかし方向は全く逆の過程によって原理的には、
ATP の性成が可能である点に着目して、Boyer [42], Greem [43],
Hackenbrook [44] 16によって本仮説が提出された。本説によれば、電子
・ 伝達によって先ずミトコンドリアの内膜成分のコンホメーツョンがひずみのか
かった準安定な状態へと変化し、二の準安定な高エネルギー状態がもとにも思
ろ過程に共役してATPが生成すると考える。最近 Green とコン(45)は
スーパーモレクル(脚注※)と呼ばれる分子集合体を仮定することによって!!!
本説をさらに発展させ、上記のひずみのかか。た準安定な状態とは、このスー
パーモレクルが分極した状態であり、複極するときにATP 合成等の吸エルゴ
ン反応を可能にするとリウェレクトロメカノケミカル説(electromechano chemit
[cal model)を発表して113[46]。また、Boyer5[47]は電子伝達の
エネルギーが必要とされるのは ATPが合成される過程ではなく、ATP が合
成された部位から遊離する過程である可能性もあることを指摘している。
* supermolecule



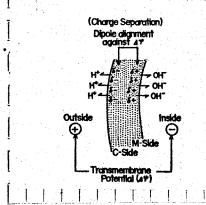
		100 (100 (100 (100 (100 (100 (100 (100
		7
【 (3)化学浸透压能(chemiosa	motic coupling hypothesis)	
生体膜の能動輸送に関する研究に	よって明らかにされて川を概念	まもと
[=, Mitchell (1961, [48]) = \$7	体系化され提起された本仮説は	東子
伝達とリン酸化反応とは膜を隔てた PH	勾配により共役するとするもの)で、原
じた小胞膜の存在が必要である。すなめ	ち,ミトコンドリア膜はH+に	対比で
不透過性であるため、電子伝達の結果 F	+ 「勾配* (正確には電気化学ホ	针沙
*ル差, Aut の二とで, H+ motive for	Gree ともいう)が生じ、二れか	'H, &
駆動して直接にATPを合成すると考え	るかけである。本仮説の実験的	検討は
数多人, 再構成実験[49, 50,51 52	〕まはじめ多くの報告が本説を	支持し
TIII 3 18, Slater [6], Chance [53]], Pressman [54] 与上步为源	なしく及
論されている。本仮説の成立のために以	t要なリン酸化部位型における 1	missing
factor (Htとe-とき分離する要素。	ア31、図30中の区)が多くの	研究者
の努力にもかかからず見り出されてリな	ココとがリつの大きな難点です	るが
らに本説の基礎となっている閉じた小脱	腹は必ずしも必要ではないとす	う報告
(55, 56, 57) tas.		
.		1 //
以上述べたように酸化的リン酸化		
見り出されているにもかかわらず、その		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
には、いまだに解明されない多くの問題		
性色素によ、てミトコンドリア膜内電荷	iの状態を調べ、それとの関連で	アジカ
· - フリラーである CCCP ** の作用機作の解	3析を試みる一方、12学修飾法を	用加
高エネルギー状態の実体を探索したもの		
* ATP合成のエネルギーき 15.6 Kal /mol	le, lモルのATP合成に2当量のHt	の移動が
ツタであると仮定すると、ATP形成のFめにのPH差が必要となる[58]。今、外液が	は少なくともミトコンドリア膜内外で 5.7gH グタであるとすると ラスフンドリア内	フユキット
2.1でなければならなり。この矛盾を解決	さするために、他のイオンの寄与さも考慮した	膜管位
の考え方(約240 mV = 相当)が導入された。 PH差にしても、人工的にHが配ま大きくした条件で	大さも、せいせい1.5(6)」である。	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
** CCCP; carbonyl cyanide m-chlorophenylhydr	razone NC;C=N-NH-Q	-
		1/2
		1

1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	'索およ	u _
除共役削,カルボニルジアニドメタクロロフェニルとドラ	ブゾン(とく	(P),
の作用機作の解析		
深料やけり光性色素などの探索試薬を生体膜系へ導入しその	機能拱	態を
調べようとする試みはいくつかなされていたがミトコンドリアの研	究分野	で注
目されるようになったのは 1969年に Azi, Chance ら[62]が	ANS	出用
ロてミトコンドリアの高エネルギー化に伴う膜のコンホメーション	変化を	45
えるニとができたと報告してからである。ちょうどその頃、酸化的	リノン酸	11KO
機構としてコンホメーション説が提出され、電子顕微鏡観察によっ	て精力	的な
検討が加えられて川た。ミトコンドリア全体としての容積変化はな	115	内膜
だけが呼吸状態に共役して急速かつ可逆的に大きくコンホ×-ショ	ンき変	化す
3= k + b, Hackenbrook [44], Green [15] 5 11, =03	ンホメ	山凹
ョン変化ニモが、ATP のエネルギーに直接変換される高エネルギ	一状態	の実
体であるうと考えた。しかしながら、その後の研究で内膜の大きな	コンホ	x -
ション変化は極微量の ADP の存在に特異的なもので、エネルギー	変換と	0 -
表的な結びつきはなく、むしろリン酸転移機構やアデニンヌクレオ	14 A 44	
アー[63,64,65]と関連することが明らかになった。現在の電子	顕微鏡	の技
付では二水以上の微細構造,例えば生体試料中の個々の分子および	その微	かな
コンホメーツョン変化を観察することは不可能なため、探索試験を		
「リア膜に導入する方法が再び注目されるようになり」上述の色素法	1X9} I=	
NMR[66] やスピンラベル法[67,68]が盛んに用いられて	川る 。	1/2
オメーション説をはなれても、二の種の研究はミトコンドリアの植	造と被	能運
理解する上で欠くことのできない多くの知見をもたらすであるう。		
AN5 を用りて細かり解析が追められる一方で、表エニ示す	ような	多(]
の染料やケイ光性色素が探索試棄として開発され、大心内次のよう	な情報	が集
精 3 机 左 [69] 70, 71]。		
田谷号 CCCP; carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone ANS; I-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid		
NMR; muclear magnetic resonance (spectroscopy)		
	ļ.	1.3

(1) 陽イオン性色素* はミトコンドリアの高エネルギー化に伴いまたコンドリア膜に結合し、その吸収スペクトルあるいはケイ光スペクトルを変化し、阻害削添加による脱エネルギー化とともにミトコンドリア膜から遊離し、 もとのスペクトルにもどる。カチオンである色素がミトコンドリアに結合すると、 それと交換に H*が放出され、逆に色素が遊離すると H*が取り込まれる。 順機のことは色素以外の脂溶性カチオン、例えば、テトラフェニルアルツにウムサイナン、テトラフェニルアルツにウムサイナン、テトラブチルアンモニウムのイオンなどを用いても確められた。 「

【『W)脂溶性カチオンを取り込むミトコンドリアとは逆に音波処理(作更 ミトコンドリア粒子**は脂溶性アニオンを取り込む。

脂溶性カチオンが取り込まれ、電気的中性を保つ



ために、それと交換にH+が放出されるとするものである。亜ミトコンドリア粒子の場合は、膜の表裏が逆になってあり、マトリックス側(M-が起 プラス)が外液と接しているため脂溶性アニオツ を取り込むことになる。Azzoneら[80]、Lee [104]、Kraayenhof[75]5は、ミトコンドリ

| ア膜を負の固定電荷を持った膜系(fixed megative-charged system)とみなし脂溶性カチオンとの相互作用を説明している。いずれにしても、ミトロンドリアの膜内電荷(マイナス)と陽イオンとの相互作用を仮定している。もう1つのこれとは全く別の解釈は②化学浸透圧説の立場にたっきので、高エネルギー化に伴って生じる膜電位(上図9、transmembrane potential、ミトコンドリア内が負)の勾配に従って脂溶性カチオンがミリゴ

ンドリア内へ電気泳動的に取り込まれると考えるもので、Skulachev [70] な

^{*} 中性付近に PKa値を有しプロトネーションの結果プラスに高電しているもの、13リネはアクリジンオレンツ アテブリンなどは永久電荷を有するカチオンとは異なった挙動をとることがあるから注範を更する。

^{**} 一般にミトコンドリアと亜ミトコンドリア粒子とでは 膜の表裏が迷になって いると考えられている(じかし女献 ())の57 さも参照)。

Jasaitis (106]らによって主張されている。 従来の研究では、単純な実験系で探索試薬の性質を詳細に調べ コれを 主とに複雑な系における結果を解釈しょうとする試みが乏しく, の, ②の申す 水が正し川かは、はっきりしなかったが、著者らはモデル実験を基礎に出て、 ①の解釈を強く支持する結果を得た。しかし細かい点まで研究者の見解が一致 するにはおとしばらく時間がかかるものと思われる。 エネルギー状態探索の分野で有用な役割を果したローダミン6G, ピナッオノ - ルの性質とミトコンドリア膜系への応用について述べ、ミトコンドリア膜は 高エネルギー化に伴って、少なくとも見かけ上、陽イオン交換膜的性質を有す るようになることを示す。それに続いて、エネルギー転移機構との関連で注目 の的となって川るアンカップラーの作用機作の解析を試みるが、その基礎とし て、次にアンカップラー研究の背景につけて触れておきたけ。 リン酸化反応とは無関係に圍子伝達反応のみが進行しATP合成が行な われなくなることを除せ役とリリノ、低濃度で除せ役作用を有する藝物をアンカ ップラーと呼んでいる。2,4-ジニトロフェリール(DNP)をはじめとして 現在までに数多くのアンカップラーが発見され、それらの大部分が (i) 脂溶性 弱酸としての性質を有することが明らかにされている。通常の実験には、DNP, CCCP. FICCP がよく使用されるが、これらのアンカップラーセミトコンドリ アに添加すると (ji) 数倍の呼吸促進 (P42, 図37 参照) とATP 生成の見 全な抑制およびATPase の活性化がみられる。ATP 合成の阻害のみならず ミトコンドリアの高エネルギー状態(X~Y)と共役した過程、例えばエネル ギー依存性のイオン透過などがす べて阻害されることより、(川)ア 容積形態変化 ンカップラーの作用部位は、図10 Uncouplers に示すように X~Yであると考定

图各号 「CCP; carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone

られる。しかしながら序論でも述べたようにX~Yの実体が不明であるため、 その作用機作に関する定説はなく、上述した(i)の性質と(ii)の作用および(iii) の作用部位を考慮して次に述べるような仮説が提出され検討が加えられている 現状である[11-6]。 (I) 化学説およびコンホメーション説の立場にたつ仮説[36,107-112] にア |ンカップラーが酸・塩基触媒として直接高エネルギー中間体を加水分解なりし は、高エネルギーコンホメーションを修飾することによりエネルギー共後まだ きなくすると考えるもので、Slater [36], Lardy & Wellman [108] 1= よ、で (II) Mitchell らの仮説 [48,113]: アンカップラーま Ht 伝道体でで あると考える説である。化学浸透圧説ではX~Yの実体として膜を界するHT勾 配き仮定するが、アンカップラーは二の Hナ 勾配を消失させると考える。すな わち脂溶性弱酸であるアンカップラー分 子は膜内のリン脂質より成る疎水性部分 CCCP にとけ込み 膜の外側で Htを結合し、 内側でそれを解離することによって、図 CCCP · H HT勾配才消失させると out in membrane Fig.11. The mechanism of proton conduction by CCCP across the membrane. (III) van Dam および Kraaenhofの仮説 [114] 115] のサイクリックな移動を特徴として口るが、化学説の立場にたつものであ り複雑な仮定をしている。(エ)、(エ)の折衷説とみてもよい ミトコンドリア膜にアンカップラーを添加すると H⁺ の透過性が増大す ることが見り出されて以来[116,122] (II)の H+ 伝真説が有力となり、その妥当 fttの検討に焦点があてられてきた。人工膜であるリン脂質膜[117+119] だりボ

ツーム膜を用いた実験[120,121]でも、アンカップラーが H+ 伝導体として

^{*} proton conductor

^{**} 解離型(Φ-)のアンカップラー分子が基質等のアニオンキャリアによってエネルギー依存,つまりなが、 走消費して膜内に運ばれ、内側で 再びつロトネーションし(ΦH),今度は自由拡散によりもよけ、 もどり、外側で解離しΦ-となる。この過程のくり返えしによって χ~Yが消費される結果アンカップルー すると考える。

				112
作用することが確められ、ハ	1itchell 1= \$15	て提出された	· - 作用機作が	強く支持さ
れるようになっている。しか	しながら、二	机5 H+ 伝送	4作用と除共	役作用とむ
直接結びつけることには異言	論もあり, 否定	的な結果も幸	及告されて11	る[は引]
中でも、Hansteins[126]	はアンカップ	ラー結合部分	d を決定する	= 2 14 4 .
て、特定部位にアンカップラ	一分子が結合	することが内	余共役に必要	なのでおり
て、一H*透過の増大は必ずし	も必要ではな	ロとしてロ	3. またリゾ	レッタな
ミトコンドリア膜を可溶化し	た実験より	Hunter 5 1	56, 128, 129	〕は膜のツ
要性を否定し、Mit chell 曽	での基盤に疑問	を投げかけて	113. さら	仁单離精製
Lた酵素標品 (F. [132-134],	ミオシンAT	Pase [135])	対してもア	ンカップラ
一が作用する事実などが報告	されるにつか	,(工)の直井	等作用説が再	び注目され
はじめている。				
以上が現在までのアン	カップラー研	究の機略では	83. CCCP	の作用機作
の解析を試みた著者らの仕事	リについては本	章ロー3トス	~ 3節で削	th, ccep
の作用機作を考える上で興味	まある 事実を示	すとともに、	H+ 勾配の	消失は付殖
的な現象にすぎないである	ことを示す。			
	To the Company of the			
ミトコンドリアは新館				
のを用川、その濃度はmg F	rotein /ml で表	示した。ニオ	1に必要なミ	トコン関系

アのタンパク量は、ビュウレット法[/37]によって定量した。分離したまり] | ドリアは 30~40 mg protein /m/となるように 0.25 M sucrose (p4カロ) 液に懸濁し、氷水中に保存した(二の条件下では、4時間後でも極めずかの失 活しかみられない)。なお、ミトコンドリアを取り出すために一般に用いられ ているホモジナイズ法ではミトコンドリアを傷つける可能性があるため、本研 ||穷ではルーズなガラス製ホモジナイザーによって||手動で大まかに膜細胞は休 モジナイズするにヒビめた。脂溶性カチオンであるローダミン6年、ヒサンア

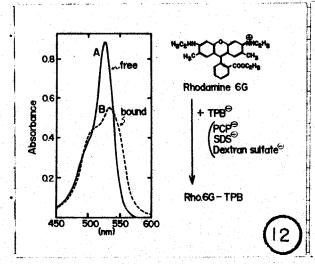
* lysolecithin (lysophosphatidylcholine)

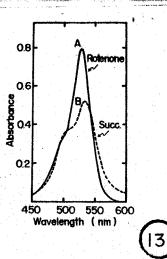
Ⅱ-3. 結果

Ⅱ-3-1. ローダミン64とミトコンドリアの相互作用

S1、陰イオン性物質によるローダミン6日の吸収スペクトル変化

| 陽イオン性色素であるローダミン 6 G は水溶液中では図 12, 曲線 A のような遊離型の吸収スペクトルを有するが、ニれにテトラフェニルボロン、パンタクロロフェリール、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)などの脂溶性アニオン|
「は添加すると静電相互作用の結果、曲線 B (図 12)のような結合型の吸収スへをクトルに変化する。ケイ光スペクトルにも著しい変化がみられる(図 13, A, B)
|参照 [81])。





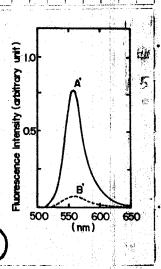


Fig. 12. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the absorption and fluorescence spectra of rhodamine 6G. Curves B and A: absorption spectra of 10 μ M rhodamine 6G with and without 250 μ M SDS, respectively.

Fig. 13. Absorption and fluorescence spectra of rhodamine 6G and mitochondria with and without succinate. Curves B and A: absorption spectra of 10 μ M rhodamine 6G and mitochondria with 1 μ M rotenone in the presence and absence of 2 mM succinate, respectively.

B' and A': fluorescence spectra

|8|2||ミトロンドリアの高エネルギールに伴うローダミン69

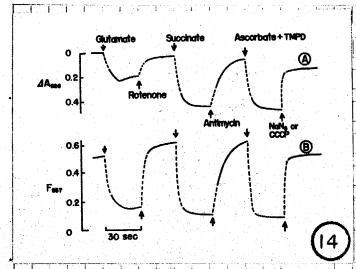
のスペクトル変化

| 図 13 はミトコンドリア懸濁液中におけるローダミン66の吸収スペク|
トルとけれ光スペクトルである。ロテノンを共存させ墓質を加えない場合には|
曲線 A, A'(図13) で示されるような遊離型のスペクトルを有しているが、| ニ
州にコハク酸を添加しミトコンドリアを高エネルギー化すると、それに伴りロ
ーダミン66の吸収およびケイ光スペクトルも結合型に変化する(図13) 曲

四番号, SDS; sodium dodecyl sulfate, (lauryl sulfonate)

線 B, B')。図 12のモデル実験と全く同じようなスペクトル変化がみられる ニとより、ローダミン6 Gカチオンはミトコンドリア膜内電荷と相互作用して 111るものと推定される。

| 「基質と阻害の組合かせによりミトコンドリアの高エネルギー状態の住成 消滅すくり返すニとができる(P4, 図6 参照)。この時のローダミン64の | 図収スペクトルおよびワイ光スペクトル変化すそれぞれ 526, 557カm の 腹 優で調べた結果を図 14 に示した。グルタミン酸、コハク酸、およびアスコル



加により吸収スペクトル (aAsz6)

ケイ光スペクトル (Fs57)ともに、
結合型に変化し、それぞれに特異)
的な阻害剤であるロテリン、アンドおよびアンカ

ップラーである CCCP によって、
しもとの遊離型にもどることがわが

ビン酸+TMPDとリッた基質の添

Fig.14. Changes in absorbance and fluorescence intensity of rhodamine 6G and mitochondria with time on addition of various substrates and inhibitors. Curve A: absorbance change, ΔA_{526} . Curve B: change in fluorescence intensity, F_{557} .

またロテリンを添加したサ

ンプル(脱エネルギー状態)と!

Succ |これにコハク酸を添加したサンプ
|ル(高エネルギー状態)|とを遠に
|するにとにより, コハク酸を添加
|したものでは実際にミトコンドリ
|アにローダミン64がより多量に
|結合して113||ことが確められた(

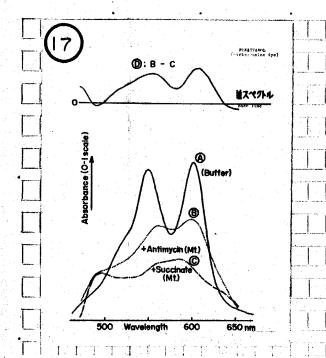
Fig.15. Relationship between the amount of rhodamine 6G bound to mitochondria and the amount of dye added to the mitochondrial suspension. Curve A, with 2 mm succinate. Curve B, without succinate. The reaction mixture consisted of mitochondrial suspension (0.4 mg protein/ml) and $1~\mu\mathrm{M}$ rotenone.

昭号, TMPD; tetramethyl p-phenylenediamine

§3. ローダミン6日の取り込みに伴う H+ 放出 前節でミトロンドリアの高エネルギー化に伴う膜内電荷に対応して、 ーダミン 6日カチオンがミトコンドリア膜に結合し、阻害削添加による脱土ネ ルギー化とともに膜より遊離してくることを示した。このローダミンも日の取 り込みおよび枚出の際にみられるミトコンドリア懸濁液中のpH変化を示した のが図16である。一般にカチオンがミトコンドリアに取り込まれると、それ と交換にHtが外液中へ放出される Rhodomine 6G Antimycin A ニとが知られている。 曲線 A.B 圧 O JM H 示すように ローダミン6年の添加 とともに外液中の pH は急激性低下 Antimycin A 30 sec し、二の時放出される HT 量は添加 16 Antimycin A したローダミン量に比例することが Fig.16. H+ changes of the mitochondrial suspension on adding rhodamine 6G and 0.5 μ M antimycin A. かかった。アンチマイツンを加えて The reaction system contained 80 mm KCl, 2 mm N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid 高エネルギー状態を消失させると、 (HEPES, pH 7.2), 2 mm succinate, 10 µm rotenone, and mitochondria (2.8 mg protein/ml) in the presence 逆の過程(ローダミン66の遊離) and absence of rhodamine 6G. Curves A and B. with 75 and $36 \,\mu\text{M}$ rhodamine 6G, respectively. が起き。一旦放出された H+ が再収 ミトコンドリア内に取り込まれるため、外液のPHは上昇し、もとの値付近に もどる。ここで注目すべきことは、ローダミン6ケカチオンの取り込みと放出 |さ||H|||の出入りで追跡できることであり||従って次節。||I|-|3|-|勾配レの関連才詳しく検討することが可能で 陽イオン性色素の一種であるピナンアノールを用いても、ローダミン6 |Gの場合と同様に、ミトコンドリアの高エネルギー化に伴う吸収スペクトル変 化(次面の図17) および色素がミトコンドリアに取り込まれる際の 円が放出 【図18)が観察された[12]。簡単に図の説明をすると; 図17.曲線画は

* pinacyanol (a carbocyanine dye); 1,1-diethyl-2,2-carbocyanine
* 透過性の陰1オン、例はずりン酸、酢酸1オンなどが存在しない場合。

. 1



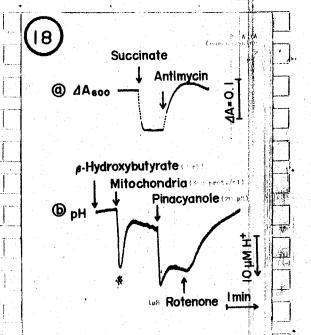


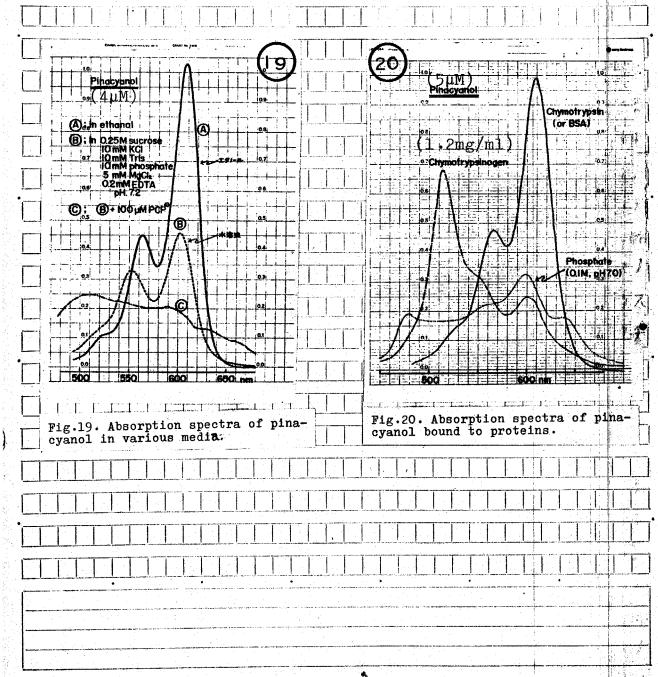
Fig.17. Absorption spectra of pinacyanol bound to mitochondria. Curve A; in aqueous solution, curve B; in mitochondrial suspension with antimycin, curve C; in energized-mitochondrial suspension

Fig.18a. Changes in absorbance with time on addition of succinate and antimycin A.

Fig.18b. pH change of the mitochondrial suspension with β -hydroxybutyrate on adding pinacyanol and rotenone.

* 図18, 曲線 Dの % FP。 この pH 変化には ミトコンドリアによる 基質アニオン (β-ヒドロキンブチレート, CH3 SHCH2COOT)の取り込みと交換に外液中へ放出される OHでも寄与してりると考えられる[138] OHが ここではあまり問題にしない。

一川・放出が起き、続くロテリン添加による脱エネルギー化によりもとにもどう ことがわかった。図17の結果は、Azzone ら〔80〕がミトコンドリア膜中の陽イオン結合部位を調べるために試みた実験結果と基本的に一致している。 図19には、ピナンアリールのエチルアルコール中(曲線 ④) およびアニオン性物質と相互作用した時の吸収スペクトルを、図20には蛋白分子と結合した場合の吸収スペクトルを示した。キモトリプシンに結合したピナンアリールと、ドモトリプシリーゲンに結合したピナンアリールでは著しく異なるスペクトルを示すことも興味ある結果でおり、ミトコンドリア膜内の脂溶性カチオン結合部位の性質を詳細に調べてめく上で参考になる知見と思われる。

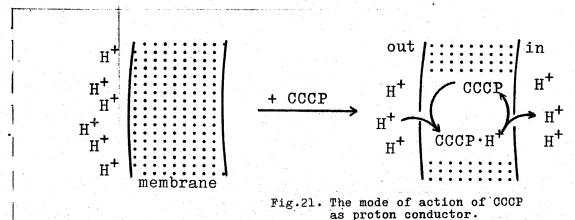


21

II-3-3. CCCPのミトコンドリアに対する作用機作

|§|1| 脂溶性カチオンを利用した解析|

脂溶性弱酸に属するアンカップラーの1つである CCCP はミトコンドリア懸濁液に添加するとpHの上昇すなわち、ミトコンドリア内へのHt の流入がみられる。CCCPによってひき起こされるこの現象はミトコンドリア膜は界するHt 勾配の二かれき反映しているものと考えられている。また、ミトコン



ドリア懸濁液に HU を加えた場合、ミトコンドリア内部が低 pHとなるまでにはかなりの時間を要するが、 CCCP の存在下では、添加した Ht がすみやがにミトコンドリア内に入るという事実も上記の考え(図 21)を支持する。現在の問題点は、 **果して、アンカップラーの有する二の Ht 伝導作用によったミトコンドリアの高エネルギー状態が消失し、酸化的リン酸化の除共役が起きているのかどうか ** ++ Ht 伝導作用は副作用にしかすぎないのではないかーーということである。 そこで脂溶性カチオンを取り込ませたミトコンドリアに「CCCP を作用させた時に、脂溶性カチオンを取り込ませたミトコンドリアに「CCCP を作用させた時に、脂溶性カチオンが遊離してくるのと、Ht 勾配がこけれるのととならがよりはやく起きるかを調べることは、 CCCP の作用機作のみならず、ミトコンドリアの高エネルギー化の機構を考える上でも興味あることにあり、以下にその結果を示す。

| コハク酸を共存させたミトコンドリアはローダミン6日カチオンを取り |込み|| それと交換に外液中へ H+ を放出する(図22;曲線A,Bの*印)。 |続リてローダミン6日を取り込んだミトコンドリアに CCCPを添加すると、図

妲

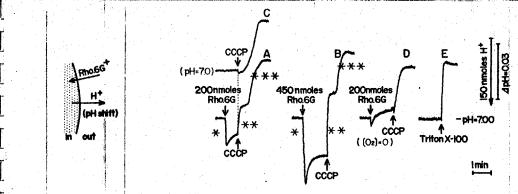


Fig. 22. The H⁺ change of a mitochondrial suspension (3.5 mg protein/ml) with 2 mM succinate after the addition of rhodamine 6G and subsequent addition of CCCP. The reaction mixture (5 ml) was maintained at pH 7.0 and 17°C.

(22)

|22| 曲線A, Bに示すように2段階からなる pH 変化が観察された。曲線内 Bの比較よりりかるように、最初のステップ(**印)の変化量がローダミンの 量を倍にすると2倍になっていること、およびローダミン添加の際のPH変化 |量 (|* 印|) |とよく|- 致して川ることより、 オー 段階目の PH 変化 (**印) | 潜結 合して川たローダミンが CCCP 添加によって遊離してくることに伴う H* の取 り込みであると結論した。このことはローダミンbGの吸収スペクトルあまが 171光スペクトルがオー段階目の変化と並行して結合型から遊離型上変化して 1113ことからも確められた。次に 2段階目の変化が何ま反映して113かま検 討した。曲線Cは、CCCP添加によってミトコンドリアのHt 勾配が二かれる 週程を示している。CCCPの添加後その効果が現かれるまでには30秒近くの 時間を要していること、おまび曲線CのPH変化量と曲線Aに示したス段階目 の PH 変化量がよく一致していることより上述した計2段階目の PH変化(KKK 印)がHT勾配の二かれに相当するものと考えられる。界面活性利(0.1%下流 |X+100|) だミトコンドリア膜をこれした場合は、曲線をに示すように、すみや かに Ht 勾配が消失する。曲線Dは無酸素状態におけるコントロール実験であ りローダミンも日の取り込みはみられなり。

画のニカれて説明することは困難であり、次の実験結果も二のことを裏づけぬ 1113。図23の曲線Aに示すように、コハク酸を共存させた高エネルギー状態

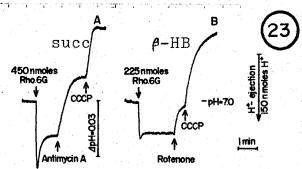


Fig. 23. The H⁺ change of a mitochondrial suspension (3.5 mg protein/ml) with substrate after the addition of rhodamine 6G and subsequent addition of inhibitors. The reaction mixture (5 ml) was maintained at pH 7.0 and 17°C.

Fig.24. pH changes of mitochondrial suspension induced by the addition of tetraphenylarsonium chloride and subsequent addition of CCCP.
Curve C: without TPAC (control).

のミトコンドリアにローダミン 6分表 取り込ませた後にアンチマイツンま添加し、脱エネルギー化させると、結合して川たローダミン 6分が遊離してくるが、この状態ではまだ Ht 勾配が保持されており、続く CCP 添加にようてはじめて Ht 勾配が消失する。曲線 Bも同様の実験で、基質として βーと ドロキンブチレートを用い、電子伝達

の阻害剤としてロテリンを加えた場合の結果である。このようにアンチマインンやロテリン添加によって脱工水能は、水能にあるミトコンドリアでも、H+ 勾配が残存していることより、性別の CCCP-感受性の H+ 勾配がりかりる X~Y そのものであるとは考え難いように思われる。

| ローダミン6G以外の脂溶性カ |チオン、例えば、テトラフェニルアル| |ソニウ4 (ITPA+), |テトラブチルアン|

モニウム (TBA+) を用いた実験でも

前員の図22と同様のことを確めることができた。 TPA+を用いた場合の結果 を図24に示した。曲線A,Bに*fpと** fpで示したように,CCCP 添加た よって,TPA+の遊離とH+勾配のこかれに相当する2段階のpH 変化が起こ ることが確められた。

四各号: β-HB: β-hydroxy butyrate

TPAC; tecraphenylarsonium chloride

Å3*

| 図22~24はUずれも PH X - ターのみの記録であったが、二州に酸素電極を組合かせた記録を図25に示す。脂溶性カチオンを取り込んだミトローンドリアに CCCP を作用させた時にみられる2段階の PH 変化のビニで呼吸が

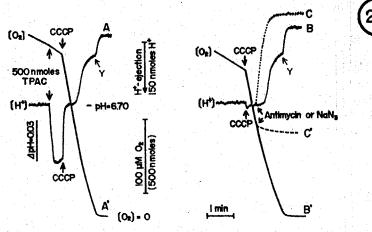


Fig. 25. The H⁺ change and O₂ consumption of a mitochondrial suspension (4.0 mg protein/ml) with 2 mm succinate after the addition of 500 nmoles TPAC (curves A and A', respectively) and the subsequent addition of 1 μ M CCCP at the points indicated by arrows. Curves B and B': in the absence of TPAC. Curves C and C': addition of 0.5 μ M antimycin A or 1 mM azide. The reaction mixture (5 ml) was maintained at pH 6.7 and 17°C.

解校*されるかを調べたものである。曲線がに示すように、TPAでの添加により、出すがいるの呼吸促進がみられた。CCCPをあると直ちにアンカることがいる。曲線をではいるよびで、Cでは脂溶性、カチオンの存在しない

|コントロール実験であるが、本章であっか。て113 cccp-感受性のH*対配 |消失過程が電子伝達系の機能状態と密接に関連して113 ことを示して113。|=| ||加にコリスは次節、II-3-3; §2で触れる。|

「一」呼吸しているミトコンドリアに CCCP を添加すると、しばらくラグタイムがあって、その後にはじめて Hr 勾配が二かれることは前に示した(p21)図

* p 42. 237参照。

|22|)が、ちょうとこの時、無酸素状態になって113ことが酸素電極による測定で明らかになった*(図26,曲線A)。そこで CCCP の存在下、無酸素状態となり H+ 勾配が消失した後に酸素を供給した場合に再び H+ 勾配が形成される

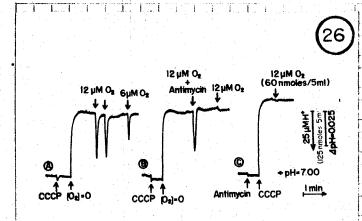


Fig.26. The H⁺-change of a mitochondrial suspension (3.5mg prot./ml) containing 0.25M sucrose, 15mM KCl, 2mM Hepes, 1µM rotenone and 2mM succinate after the addition of CCCP and subsequent addition of oxygen. 25°C, pH 7.0.

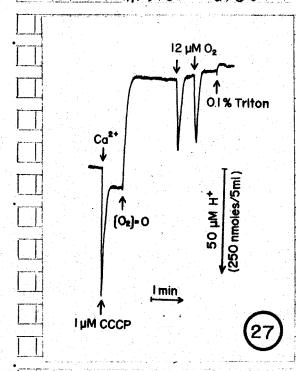
かどうかき調べたのが左図26で おる。曲線 ② に示すように ※加 する酸素量に応じて HTが放出されることがわかった。酸素とアン チマイツンAを同時に添加した場合の結果を曲線 ® に示したが、 この場合にも HT 放出がみられる ことは、アンチマイツン阻害がか かる前に、すばやく酸素が消費されてしまうことを示してあり、酸

素消費とそれに伴うHT放出反応とは極めて速い反応であることがかかる。アンチマイシンによって電子伝達が阻害された後では、当然子想されるよう目が酸素パルスによるHT放出はみられなくなる(曲線 ⑤)。曲線 ⑥ はアシリマイシンによって呼吸が阻害されている状態では、CCCP 添加と同時に HT 数配がこめれ、急激な pH上昇が観察されることを示している。以上のことより
次の2点が明らかになった。

- [| (1) 少なくともコハク酸を墓簡とした場合には、無酸素状態になるが ある川は阻害剤によって電子伝達が止まった状態ではじめて、CCCPによって [H+ 勾配がにかれる。]
- | (ii) | CCCPの存在下でも酸素パルスにより H+ 放出が起こる。| これらの結果は、化学浸透圧説の立場にたつ従来の説明、すなわち CCCP は H 佐導体としてのみ働き、従ってその存在下では H+ 勾配の形成はみられないと

^{*} ミトコンドリア懸濁液にアンカップラーを添かりすると外液のPHが上昇することは Calafoli と Rossi [140]によって 1969年に見い出されているが、無傷のミトコンドリアでは、CCCPの添加後、無酸素状態になってはじめて PH上昇が起こることを示した (図26)のは これが はじめてである。ミトコンドリアを分離する際に過度にホモジナイズしたものでは 一呼吸活化的 等に何ら異常がなくても ― 従来の報告のように、CCCP添加と同時に PHの上昇がみられた

する考え方では解釈することが困難であり、ICCCPの作用機作を考える上で興味ある事実である。次の図27,28 も CCCPのH+ 伝導作用は二次的なものであり、アンカップラーとしての本質的な作用は、それとは別の機構で発現されていることを示すものである。



| C& の取り込みに伴う H*の放出 | き測定することによって、ミトコンドリ | アの C& 取り込み能を調べることができ | る。このことき利用して C& イオン 介輸 | 送と上述した H* 勾配との関連を検討し | た結果が図 27 である。エネルギー依存 | 性の C& イオンの取り込みの途中で、ミ | トコンドリア懸濁液に CCCP を添加する | と、図 27 に示すように添加と同時に | 旦取り込まれて 川た C& が遊離し、外液 | の PHがほぼ元のレベルに回復するが

Fig.27. The H⁺-change of a mitochondrial suspension during the Ca²⁺-translocation and the pulsed oxygenation. Additions: 100µM CaCl₂, lµM CCCP. Other conditions are the same as in Fig.26.

H+勾配のこかれは少し遅くれ、無酸素 状態になってはじめて起こることが沸かる。 CCCPによってミトコンドリアが除 共役していることは、Cをサイオンの取り 込みが阻害されていることより明らかを

おる。このように除共役した状態でも酸

素パルス法によってH+ 放出がみられるのは先の図26の場合と同様である。 膜を隔てたH+ 勾配が消失した後に、非イオン性の界面活性剤である たけられず |X+100で膜をこれしても、何らpH 変化はみられない。 Cc+イオンの分り性だ イオンを用いて、上述の図27と同様のことを確めたのが図28である(效象)。

* Triton X-100;	P-Isooctylphenoxy	olyethoxyet	hanol n=1	0		- ' '	•		1
	24. 22. 3. 3. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4. 4.	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,							14
	H (CH2CH20), - 0-	D)-CoHm	C34 H62 On =	647.	Œ, T 0	.1% 1#	1.5	5 m	M/= in
	相当する。								ilei e
		and the second second second second						1	13 15

•

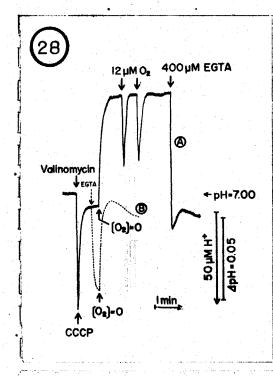


Fig.28. The H⁺-change of mitochondrial suspension after the addition of valinomycin, CCCP and O₂. Other conditions are the same as in Fig. 26. Addition: 0.05μM valinomycin.

無傷のミトコンドリア膜はKt に対して不透過性であるため、Kt の透過を特異的に促進するバリノマイツンを外部より添加する必要がある。Kt はあらかじめミトコンドリア懸濁液中に加えてある。Kt の取り込みには PH X ーターで追跡はることによって、Kt の輸送を調べた結果が曲線 ①(図28)であり、曲線 ②には カルシウムイオンの効果を完全に除くために EGTA を共存させた場合の結果*を示した。 CCCPによって、まずエネルギー依存性の Ki

の取り込みが阻害され、続いて無酸素状態に なると同時に H⁺ 勾配がこわれることが れか

には別々のことであるが、CCCPの添加によって実験的に @, @ ま区別 する ことは困難とされて川た (p32, 図31 参照)。図27, 28のように、日本展 算型に分類されて川るアンカップラーによって、 @, @ま別々の過程として観察したのは本報告がはじめてと思われる。

* EGTA 添加時にみられる急激な pH変化は、ミトコンドリアに内在して II た c& と EGTAの反応によるものと思かれる (c&+ Hi EGTA+) (c EGTA+ 24) に II に lo 反応は利用して c と 定量するにとも可能である [141]。 c c と さ 含まな IIIミトコンドリアは調製することが困難であることから迷に c c イオンの役 割につけて興味ある結果と報告している研究者もある [142]。

略号, EGTA; glycoletherdiamine-N,N,N,N-tetraacetic acid.

11

11-4. 考察

□-4-1、ローダミン64を用いて得た知見

| 前節で得た結果をもとに、推論[69,81,86,143]をも加えて、ローダミン6| | Gカチオンとミトコンドリアとの相互作用を模式的に示したのが図29である。

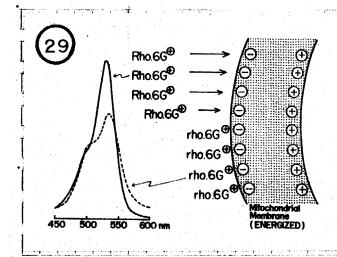


Fig. 29. Hypothetical scheme of energy-dependent rhodamine 6G binding to the mitochondrial membrane.

ミトコンドリア膜内に日で表示したのが、ローダミン6日分子と相互作用すると考えられる求核性残量であり、ある程度疎水性部分に位置していると考えられる。

吸収スペクトルの変化としては電荷を中和されたローダミ製66分子どうしが相互作用*(プラスに荷電しているときは反換しお

う) する結果, 兀電子系のエネル ギー準位が変化することによると

考える方が最も妥当であろう。このことは、ミトコンドリアの濃度に比べて色素の濃度が薄すぎる時は、色素の結合に伴う HT 放出はみられるが、色素間の相互作用が起きないため吸収スペクトル変化がみられなくなる**ニとからも支持される。図15(p/6)をもとにローダミン66の結合部位数を算出すると別をトコンドリア蛋白 1g おたり、20~40 μ 当量***という値が得られる。別人をよるmes[7/1]はアテブリン色素の場合について 43 μ 当量という値を報告 [1711]る。ミトコンドリア腰成分、例えばチトクロム類や月、の存在量は、それでれ 08、03 μ mole 1g 蛋白以下であると推定されている[144,145]から | によりの分子と上述の結合部位を1:1対応させることは無理であるが、結合部位として蛋白分子中やリン脂質中の求核性残基で考えれば量的に十分である。

□□□□ダミン6 Gは膜内電荷探索試薬としてのみならず、エネルギー転移
阻害剤 としても有用であることは先に初沼 [146] が報告したが最近 Gear
[147] もこの点に注目してローダミン6Gの作用機作の解析を進め、 キトコ
ンドリア膜に存在するアデ=ンヌクレオチド担体***を不活性化することを見り
出している。この種の阻害剤としては他に、アトラクチロンド[148]やポシク
Lキック酸[149] *** が知られているが、Gear 5の報告によれば、アトラ
クチロンドやボンクレキック酸はミトコンドリアのエネルギー状態とは無関係
アデニンマクレオチド輸送を阻害するのに対し、ローダミン66の場合は
高エネルギー状態のミトコンドリアに限ってアデニンマクレオチド担体を木銭
性化する点が特に興味深いとしている。この結果は次のように説明することが
できる; 高エネルギー化に伴って取り込まれたローダミン6日の少なくとも一
部がアデニンマクレオチド輸送系に結合することによって、アデニンヌクレオ
Fド担体が不活性化されるが、ミトコンドリアの脱ュネルギー化とともに結合
LTUたローダミン6日が遊離するため阻害も解除される。 結果の解釈のと
二ろでも強調したように、ローダミン6Gの標的となっているものがエネルギ
一転移の際に極めて重要な役割を果していることより X~Y の実体ではないか
と推論することも可能であり、本章で述べた結果と矛盾する点はない。
脂溶性カチオンのミトコンドリアに対する挙動は次の 〇 に示すように
化学浸透圧説の立場にたつ解釈でも説明可能であるが、膜内電荷の立場と主張
[[たのは、注として以下の理由(固の1,11)による。]
□ A:化学浸透圧説の立場にたつ解釈; 本説に従之ば高エネルギー状態
□□□のミトコンドリアではその膜を界して内部が負となるように約240㎜
の膜電位が存在しており。二の膜電位に対応して脂溶性カチオンがまト
コンドリア内へ電気泳動的に取り込まれると考える。 のようにまりコ
[
[場合には、×タクロマジーを起ニして吸収スペクトルを変化し、サイ光
* 高エネルギー状態の生成には何う影響を与えないが X~Yから ATPが 生成する過程を阻害する(図6)
** adenine mucleotide (AdN) translocase; ADP-ATP carrier. *** atractyloside, bong krekic acid.
* 実測値に関しては p7 脚注参照。

き有しているものに関しては濃度消光[150]が起こると説明される。脂 溶性カチオンの取り込みの際にみられる日が放出は、脂溶性カチオンに よって電子伝達系(一日サホーンプと考えてより)*が活性化された結果で あると考えるかけである。 しかしながら、B-D:島エネルギー状態のミトロンドリアにアンチマケシン き添加して脱エネルギー化した場合、Nat, Kt, Ht イオンの再配列がみられ ないにもかかわらず、脂溶性カチオンは取り込まれなくなる。膜電位の大きで と方向を決定するのは主として Mat, Kt, Ht などのイオン勾配**であるから、 これらのイオンの濃度勾配が変化することなしに膜電位が消失するという主と は考えにくく、従って脂溶性カチオンの動きを膜電位に帰することは困難であ る。また川りの配に代表される膜電位が高エネルギー状態をのものであると川 う考え方にも無理があるといえよう。(B-II):上述した (B) の解釈では脂溶性 カチオンの取り込みの際にみられるHT放出現象は説明されるが脱エネルギー 化によって脂溶性カチオンが遊離する際にみられる HTのミトコンドリア内へ の流入を説明することは困難であり、イオン交換的な過程を考えざるを得ない 時に図22(p21)に示したようにローダミン6日を取り込んだミトコンドリア IE CCCP を添加した時にみられるス段階のPH変化はそのことを強く支持して 川ろ。イオン交換的な Htの出入りでなく、膜を隔てた Ht 勾配の生成・消滅 であるとすれば、CCCPによってス段階のPH変化は観察されず、両者出りら しょにした変化が一度にみられることになるからである。 | Ca+ イオンの膜透過の研究を精力的に進めて113 Lehninger 5[15] 11を ミトコンドリアドノはが取り込まれる際にイオン交換的過程が関与している影 とは報告して川る。概略を示すとは高エネルギー状態のミトコンドリアはです を取り込みそれと交換に外液中へ Htを放出することはすでに述べた (内なが) 図27)。また電子伝達系がHTポンプとして働いていると考える化学浸透圧 | ||に従えば、コハク酸と基質とした場合には1対の電子あたり4個の川が放

は老えなり、

^{*} H+動成送性の呼吸金質(proton translocating respiratory chain)とものはいる。 P31 図30 |= 化学浸透圧説に基づくH*輸送の模式図を示した(在だは配明はなく仮説にするない) U-はミトコンドリア膜を透過しないとされている。また上述のAの説明では膜内電荷の寄ち

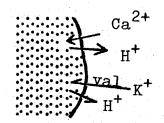
riāl •

出される=とになる(H+/2e-≈4; p31,図30参照)。ところ	3が、Ca [†] 取り
込みの際にみられるHT 枚出量とその時にコハク酸から酸素へと	上伝達された電
子数とを比較すると1電子対(2e-) おたり 6個とこえる H→カ	放出されて川
ることがわかり、長川間、化学量論的に説明できない、現象とこ	けれてきた。
Lehninger らはマウス白血病細胞より分離したミトコンドリアで	ごは特にその傾
向が著しく, 1電子対あたり20個以上のH→(H+/2e-1>20)か	『放出される =
とま見川出し、Cd+の取り込みの初期にみられる急激な H+ 放出	出現象を電子伝
達に伴う Hナ 放出では説明できないとしてイオン交換的過程,	すなわち、「など
結合部位にプロトネーションした残墓があり、これにCatが結合	
と交換に H゙が放出されると考えるべきであろうと述べている。	1 11 4
と脂溶性カチオン結合部位がどの程度一致しているかは今後明ら	- 1 × 1
ればならない問題であるが、脂溶性カチオンの場合にもイオンを	を換的に 円が
外液中へ放出されているものと類椎される。	
	- The state of th
しい差異は、膜内電荷近傍の大きなコンホメージョン変化を反射	一 1
と推定されるが、二の意味で、皿章の仕事すなわち化学修飾法目	まはってコン株
メーション変化をとらえることができたことは興味深い。	
· □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □	
川るアンカップラーの作用機作につけて、酸素パルス法を用い、	
関連で調べた。結果のヒニろに示したようにミトコンドリア膜は	
「イオンの消長には極めて興味深いものがある。 H+輸送をとも	و للفند الحالمات الماسات
リアの反応には次のようなものが考えられる。	
* superstoichiometry	
**	

*

$$ATP + H_2O \Longrightarrow ADP + Pi + nH^+$$

② 陽イオンの取り込みに伴う交換反応



③ H[†]輸送性の電子伝達反応(右図30)

化学浸透圧説によれば、非ヘム鉄蛋白(FeS J, I, I) サチトクロム(b, c, a, a,)などのロチ吸金質成分がらわンドリア内膜中で、図31のように配列していると仮定し,この電子伝達系の作動かによって、FMN, GQ, となどの

* H キャリアーが「膜の内側」で還元され(ス+Hn+セラZH)外側」で画変化される(スH→Z+Hn++セ) 然言果、プロトンが「内から外へ輸送されることになり、中吸金貨はプロトンポンプの値かきでしていることになる。しかし、現在のところは、推禁備のすると出ないといってよかるう。

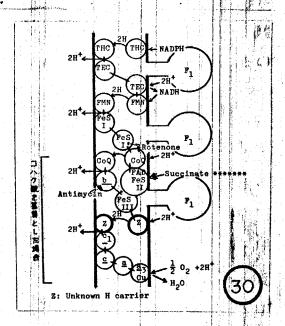
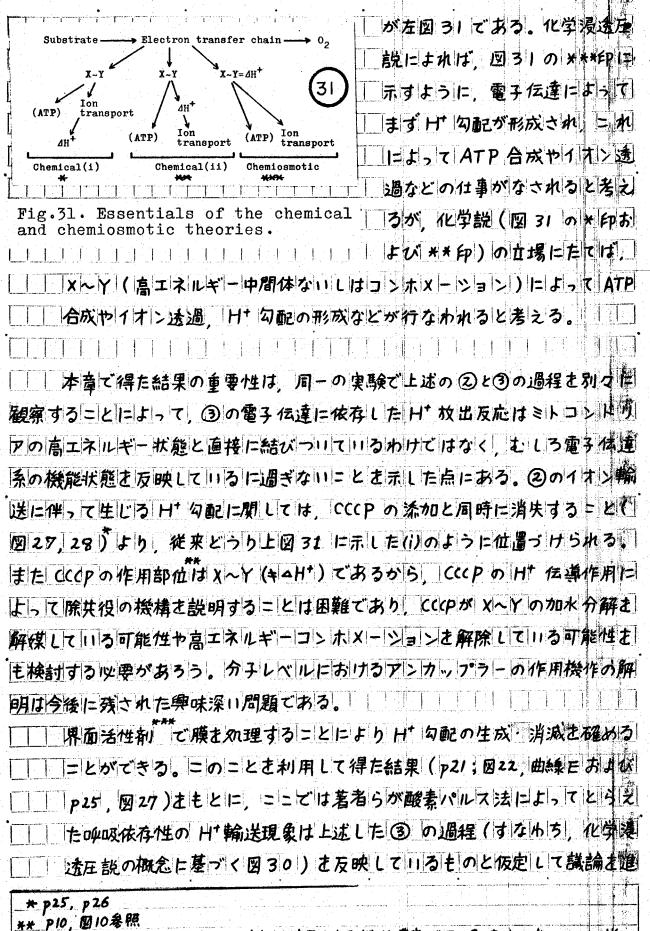


Fig.30. Pathway of proton and electron transfer, according to the chemiosmotic hypothesis.

[] 0, ②の週程はすでに確立してい	るが、③に関し	ては完全に証明された
	もある[152]。	①,②とは別に、電子
伝達反応に直接依存した H+ 放出す	見象が存在する	ことは著者らの結果(
	るが、二州が果	して③ のような機構
によるものかどうかに関しては確認	証がなく、コン	ホメーション変化に伴
□ I う H+ 放出としても説明し得るか	らである。本章	の主旨(立場)は,核
りに③の過程の存在を認めて議	論主進めた場合	③ の結果性じる肝
勾配は高ェネルギー状態(X~Y)	と直接結びつけ	得るかどうかを検証し
ようとしたものである。結果は否!	定的であったが、	CCCP の作用機作に
関しては興味おる事実を得ること	ができた。前述	の①~③の関係を一般
化的リン酸化のモデル(P6~ P1	7参照)に基づ	いて模式的に示したの
9	9	
* H carrier, (o Q o 場合; CH30	3 2e, 2h, CH,0-	



*** - 般に Triton x-100 (p25 貼P注)が使用されるが 化濃度で用いる時は Valinomycin 様の

作用が表われるため注意が以雪である〔153〕。

	e de la companya de La companya de la co		e e e e e e e e e e e e e e e e e e e			
العامدات الرابات	13th 4775 13 45 1-			4	1, 12 (0.) 74 (1	33
						後構で起きる とすれば新し
					1	わばならない
	•		11			の解明にあり
	待される。					糸口も与之ろ
THE TONCER						
						的であるが、
基質添加によっ				11		
象が Snoswell					i	
められているが			The state of the s			
とは直接関係が	- ······		1.	f .		1. 1 4. 4. 4.
リプラーの作用				The state of the s	the state of the s	
彼らのデーター			1.75			人名 人名英格兰 医内部外外
呼吸が促進され			and the second second second	1	APP CONTRACTOR OF STREET	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
よりは、むしろ						
を消失させるこ						○ 計算と終め数となり。
者らの結果と考						
			1		用才直接:	結びつける三
とはできない=			i			1
156] 1=4, 7		· * * * * * * * * * * * * * * * * * * *				• I I i i i i i i i i i i i i i i i i i
ノンやアンチャ	•			H .	1 1 1	
H+伝導体とし						
5 [15/7, 158]					A	
コヒに成功し				1		I I H
起きないことを		and the second s		44	7 1 1 1	
あるが、CCCP					4	
4,01-1,1-1						
		3				F 31

[[]], 一一, 序
膜に関する研究は、従来主として界面化学の分野で行なかれてきたが、
最近になって多くの分野で膜の問題が注目されるようになってきた。特は、生
命現象の広範な領域にわた、て生体膜が果している重要な役割が認識されるよ
· うになって以来、生体膜への関心が急速に高まっている。
生体膜はすべての細胞にとって構造上の基本要素であるとともに、多様
な機能主営む各種の機能蛋白質からなる酵素系を含み、細胞内代謝にあって中
心的役割を果している。膜系もまた細胞内における代謝の流れの中で生成分解
述くり返していることはいうまでもない。
めには細胞内における構造的機能的単位と考えられる生体膜に関する知見が不
可欠であることより現在盛んに、膜系(細胞内構造体)の構造と機能の関連な
らびにその生成分解の機作が研究されつつおる。この結果、生体膜の基本的性
質に関してはある程度明らかになり、膜の両側におけるリピドの非対称分布。
「[159] H Singer 6の流動モザイク膜モデル** [160]が提出されて川智
が、ミトコンドリア膜をはじめとする個々の膜系、例之ば、筋小胞体膜、感覚
受容膜、葉緑体膜などの有する機能の特異性を構造との関連で十分に説明する
日は至っていない。
生体膜研究法の主なものとしては電子顕微鏡およびニれにフェリチン抗
体法は組合かせた免疫電腦法などの形態学的方法、X線回折法、探索試験を膜
に導入して情報を得るスピンラベル法やケイ光ラベル法。CD·ORD·NMR
ませ食凶た分光学的方法、示差熱分析法などの物理化学的研究法 および超遠心
機やカラムクロマトグラフィ、電気泳動法などの分離分析技術の進歩によって
可能となった膜成分の単離・精製・再構成法[49,161], 酵素処理法[162]
化学修飾法などの生物化学的研究法がある。遺伝的にある特定の膜成分は欠除
させた変異株を利用する方法[156,163]や生体膜のモデルとして人工膜(り水)
* asymmetrical lipid bilayer (アミリ基を有するホスプチジルーエタリールアミンやセリンは内倒リニ多く、ホスプッチジルンコリンやスプンゴミエリンは外側リニ多く分布する未血球膜)

fluid mosaic model 文献は最近の総説[164,165

××

BAB CD; circular dichroism (円備光二色性)
ORD; optical rotatory dispersion (港州分散)

[V]-Z	かどじわり) 末田 1162#	オスナニュ	右田がち	ス 時担金	き 分子レベル
territor in a con-						なるものと思
	。本章では化					
				17		·用II·Sn 蛋
						アミノ酸共基
		the feet of the second second second				のみ反応する
4.2				9.4		は生体膜研究
						化学修飾片ま
	たらされるな					
						莫の外側成分の
·						リ用してラベル
	する方法 [20	0,202]もある	·= #51	す膜のどち	ら側にどの	の成分が存在す
		A Company of the Comp				には二個性試験
	による架橋法	ききっちれる	[177].			
(2)	機能発現に限	月与する残基な	さいしは成べ	分分子の推	建定:修飾	まって特定の
İ	機能が失活す	ることに着目	するもので	ご、古くよ	り阻害剤と	(して用川5帆
	ているSH曽	薬はニれに屋	する。Do	CD [189]	TNM (185,	206] 法用川仁
	例もおる。					
(3).	機能発現機件	E(コンホメー	ション変1	と等)の解	解:膜の根	能长態 一侧
						はネルギー・高
		•			化环烷基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲基甲	十二対心中
						反応する作物
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			the state of the s	4 9.	が高級を
						[178] Z
						赤血球機片。」
					and the second second	7, 7州 (26) [2]
	クロロプラス	くト膜に用りた	研究など	があげられ	1る。	
me E	Section was dis-	clohexylcarbodiim	ide	TNM: tetra	mitrometham	
四各号,	NEM: N-ethyl	maleimide				
	DTNB; 5,5-dith	nio-bis (z-mitroben	izoic acia)			

調べるためにアミノ酸およびその誘導体(50mM、反応液B)にアクロレイン
セ反応させた後、修飾されなかったアミノ酸残茎をそれざれ、アミノ墓はTNBS
法(220), SH基はDTNB法[221],グアニジニル基は坂口反応によって随量で
反応の有無は検討した。
反応にともならミトコンドリアの形態変化を(i) 分光学的にとらえ間接
的に反応を追跡すると同時に、(ii) 反応物のケイ光強度を測定して反応量を調
べた。ダンシルクロライドは普通アセトン溶液として使用される[222]が、目
トコンドリアに対する影響を考え本実験ではエチルアルコールに溶かして用い
使用のたびに新しく調製した。ダンシルクロライドの正確な濃度はアセトン中
における 369 mm の分子吸光係数を 3690 として分光学的に決定した。
(1) 反応に伴う形態変化の分光学的追跡;540mmの波長における吸肥
度変化(bA540)でミトコンドリアの形態変化を追跡する二とができる。一般.
二
反応系: 0.25 M Sucrose 15 mM KU, 0.1 mM EGTA 12 mM HEPES buffer,
pH 7.4 , 20°C +-+
墓 簟および阻害剤濃度はアクロレインの場合と同じ(p36)。
(ii) 修飾された膜のケイ光強度測定法; トコンドリア懸濁液 (Img
蛋白/m/;20m/) にダンシルクロライド(50μM)を添加し、4分後にシス
コンドリアを集め 1% SDS 溶液 (10mMリン酸) pH20;5ml)で可溶化し
11% SDS き含む 10mM リン酸溶液 (pH 7.0) に対して透析し、ダンンル化
1% SDS き含む 10mM リン酸溶液 (pH 7.0) に対して透析し、ダンンル化 された膜成分を得る。反応生成物以外に、ダンシルクロライドの加水分解物を
1% SDS き含む 10mM リン酸溶液 (pH への) に対して透析し、ダンゴル化 された膜成分を得る。反応生成物以外に、ダンシルクロライドの加水分解物を 強川ケイ光を有するので透析で十分に除去する必要がある。透析後、自記分配
1% SDS き含む 10mM リン酸溶液 (pH 7.0) に対して透析し、ダンンル化 された膜成分を得る。反応生成物以外に、ダンシルクロライドの加水分解物を

ケイ光光度計(日立 MPF+2A)を用い、350mmの光で励起しケイ光強度 相対値)を測定した。 (iii) 電子顕微鏡による観察法;ダンシルクロライドとの反応後 ンドリア懸濁液 (20ml) に固定剤であるグルタルアルデヒドを1%となるよ うにかな、直ちに遠心しミトコンドリアは集め、これをさらにグルタルアルデ ヒド(1%, 0.1M リン酸, PH100;4°C, 30分)で固定した後、1%オスミ ウム酸で後固定(4℃、6時間)し、エチルアルコールで脱水処理後、エボン 樹脂に包埋し切片を作製、続いて、一個酸ウラニルおよびクエン酸鉛で電子染色 L 電子顕微鏡 (日立 HS+9) で観察した[1223 SDSディスク雷気派動法 ミトコンドリア膜のどの成分がダンシル化されたかを調べるためにWebot | E Osborn の方法[224] | 一位。て SDSディスク電気泳動を行い。 171光スキ ヤナー (ヤスト科学, SFR-21) で名バンドのケイ光強度を測定した。マーカー色素と してはBPB(プロモフェリールブルー)を用い、ゲルの架橋削としては×チャ ンビスアクリルアミドの代りに ethylene diacrylate を使用した[225]。試料の 調製は以下のように行った;ミトコンドリア懸濁液(5ml, 3.5mg protein/ml) |E|ダンシルクロライドは150 MMとなるように添加し、ス分後、遠心によって ダンツル化されたミトコンドリアを集め、0.2% B-X ルカプトエタノールま含 比1% SDS 溶液 (4ml) で可溶化後,透析し(外液は10mMリン酸,1%を防 0.1% β-Xルカプトエタノール, pH20), 電気泳動用試料とした。ケイ光ラベ ルレたリン脂質(Flu-PE)は、ホスファチジルエタノールアミン(プロロホ ルム: Xタリール, 2:1溶液) ニフルオレスアミン[226]ま反応させて調製し |= 水走 1% SDS 溶液 (10 mM リン酸, pH7.0) |= 懸濁, 校 置後, 上清の一部を とって電気泳動しリン脂質のマーカーとした。ゲル濃度はタラ% * phosphatidyl ethanolamine (R)~~~~CO-O-CH

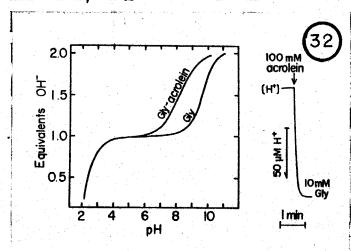
田名号, SDS; sodium dodecyl sulfate

四-3、結果

皿-3-1. アクロレインによる修飾

81、アクロレインとアミノ酸および蛋白質との反応

| 一般にアミリ基が修飾されるヒモの pka値が大きく変化することが知ら | 州て川る。従って pka値の変化によってアミリ基の反応の有無を調べることが |できる。 pka値と求めるためのアルカリ滴定曲線を図る2 に示した。アクロレ



インま反応させたグリシンではア ミリ墓の pka値が大きく酸性側に ずれており実際にアクロレインに よってアミリ墓が修飾されている ことがわかる。 pka値の酸性側へ の移行は H+ 放出を伴うので、側 えば図 33-bに示すように、グリ シン溶液にアクロレインを添加す

Fig.32a. Titration curve of 50 mM glycine, in the presence and the absence of 0.7 M acrolein, with 2N NaOH.

Fig.32b. H^{\dagger} -production by the reaction of acrolein with glycine. Medium: B.

ると「H*の放出が高感度」PH X ー ターに記録される。次に、アクロ

レインの修飾試棄としての基本的

性質(反応性など)を検討したと

表皿 日は、アミノ酸およびその誘導体にアクロレインを作用させた際の 水酸 値の変化、 日 放出量、アクロレインとの反応の有無を示した。アミノ基礎に

TABLE III

pk. SHIFTS, THE AMOUNTS OF H+ PRODUCTION AND THE REACTIVITIES OF AMINO ACIDS AND THEIR DERIVATIVES WITH ACROLEIN

Amino acid and its derivative	Functional group	pKa shift*	H ⁺ produc- tion** (μM)	Reactivity**
		9.7- 8.4	110	_
Glycine	α-Amino	9.1- 8.0	216	
Serine	α-Amino	771		
Ethanolamine	Amine	9.5- 7.8	266	+
N-Acetyllysine	ε-Amino	10.1- 8.3	106	+
N-Acetylhistidine	Imidazole	6.8- 6.8	0	in the ending the second
N-Acetyltyrosine	Phenol	10.1-10.1	0	-
N-Acetyltryptophan	Indole	_	0	i i
N-Acetylarginine	Guanidinyl	- 1	0	-
N-Acetylcysteine	Sulfhydryl	_	0	+

^{*} Reaction mixture of 20 mM each amino acid and 0.5 M acrolein was titrated with 1.0 M

^{**} To 10 mM solutions of each amino acid containing 80 mM KCl and 2 mM HEPES buffer (pH 7.0) was added 100 mM acrolein.

|a|-|P|ミリ、|E|-アミリ、|アミンの欄に示したように、反応の結果 pka値の変 化き起ニレHtを放出するがその他の残基ではHt 放出はみられなり。修飾に

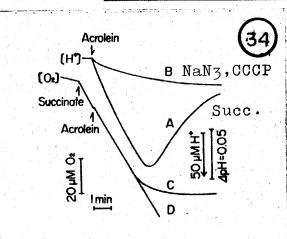
33 of H-Production 200 150 100 50 Amount 20 Hemoglobin Concentration (µM)

Fig.33. Relation between the hemoglobin concentration and the amount of H+ produced by the reaction of hemoglobin with 100 mM acrolein.

よってpKa値が低くなるものほど 多量の H+が放出されるニとがわ かる。SH基はアクロレインと変 応はするが H+の放出は観察され ない。従ってアミノ基のアクロレ インによる修飾をHサ 放出で客易 上追跡することができる。 X上は アミノ酸とアクロレインとの反応 12711てであるが、アクロレイン が蛋白分子とも実際に反応しHサ き放出する = とを確めたのが図3

である。 HT 放出量はヘモグロビ ン濃度に比例して川ることがあが

ンドリアとの反応



ミトコンドリアへの応用例を図み に示す。基質を共存させた高エネル対域 状態と阻害剤を添加した脱エネルギー状 態のミトコンドリアにそれぞれアクロレ インを反応させ、その反応性の差異より 膜の高エネルギー化に伴う構造変化は探 ぐろうとしたものである。CCCP TO NANS などの阻害剤を共存させたミトコンドサ

アにアクロレインセ添加Uても、曲線B

Fig.

Change in H+ and O2 levels of the mitochondrial suspension with time by the addition of 45 mM acrolein. Curves B and A, change in H+ level of the mitochondrial suspension (3.5 mg protein/ml) with 2 mM succinate in the presence and the absence of 1 mM azide, respectively. Acrolein was added to the reaction mixture when the succinate-induced H+ production was completely stopped, which is indicated by the arrow. Curves C and D, change in O2 level of the mitochondrial suspension (3.5 mg protein/ml) plus 2 mM succinate with and without 45 mM acrolein. Acrolein was added at the points indicated by arrows. pH 7.0, temp. 18 °C.

に示すようにわずかの H+ 放出しかみられないが, ニれ	一比」甘阿二女为
ハク酸を添加したミトコンドリアの場合には大きな PH	
H+ の放出量はミトコンドリア量に比例 L(図35). ト	「双正迷房は添加力」
ロレイン量に此例する(図36)。	
Acrolein Acrolein	£ (36)
1 8 150 A	3 150
B ± 50	To the state of th
	50 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
D Mitochondrial Protein (mg/ml)	O 100 200 Acrolein Concentration (mM)
Fig. 35 Relation between the amount of H ⁺ produced from the mitochond	rial membrane by
the addition of 50 mM acrolein and the mitochondrial protein concentration and D. mitochondrial membrane containing 0.6, 1.6, 2.6 and 3.5 mg of pro	tein, respectively.
Curve E, plot of the amount of H ⁺ against mitochondrial protein. pH 7.0, tem	p. 18 °C.
Fig. 36. The rate of H ⁺ production from the mitochondrial membrane (3 mg proby acrolein at various concentrations. Curves A, B, C, D, E and F, H ⁺ production from the mitochondrial membrane (3 mg proby acrolein at various concentrations.	rotein/ml) induced
acrolein at 16, 32, 47, 65, 128 and 188 mM, respectively. Curve G, relation be production and acrolein concentration. Substrate, 2 mM succinate. pH 7.0, te	tween rate of H+
· 作用部位の異なる阻害剤(p4,図6参照)を用い	てきトコンドリアヒア
1710レインの反応を検討した結果を表かに示した。電子	-伝達系の阻害剤および
アンカップラーはアクロレイン添加によるHT枚出さ完	المستعدد والمناب فأراب والمناب
の性成を阻害しないオリゴマイシンはアクロレインによ	るHケ牧出にも何ら影
響は与えない。従ってアクロレインとの反応によるHt	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
の高エネルギー状態と密接に関連してリることがわかっ	The state of the s
Table TV. Effect of inhibitors on acrol	Lein-induced
Azide(1 mM) + Antimycin(0.5µM) +	+(effective)
2-Thenoyltrifluoro- acetone(1 \mu M)	
Rotenone(1 μM) -	+
CCCP(1 \(\mu \text{M} \) + Oligomycin(2\(\mu g / \mu \text{I} \) -	-(ineffective)
* H*の校出が一定値に達した後に、もどり(pHの上昇)がみられて検討した H*勾配のこれれに相当するものと思われる。	つか、一切はアル耳(アンク)
CIXPICI-II YOUVI-ANALT JOURNAL	

83. 電子伝達系に与えるアクロレインの影響

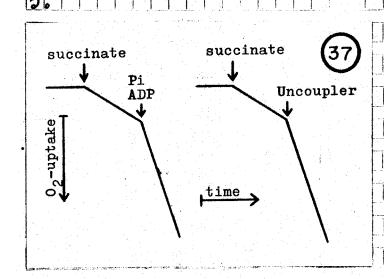
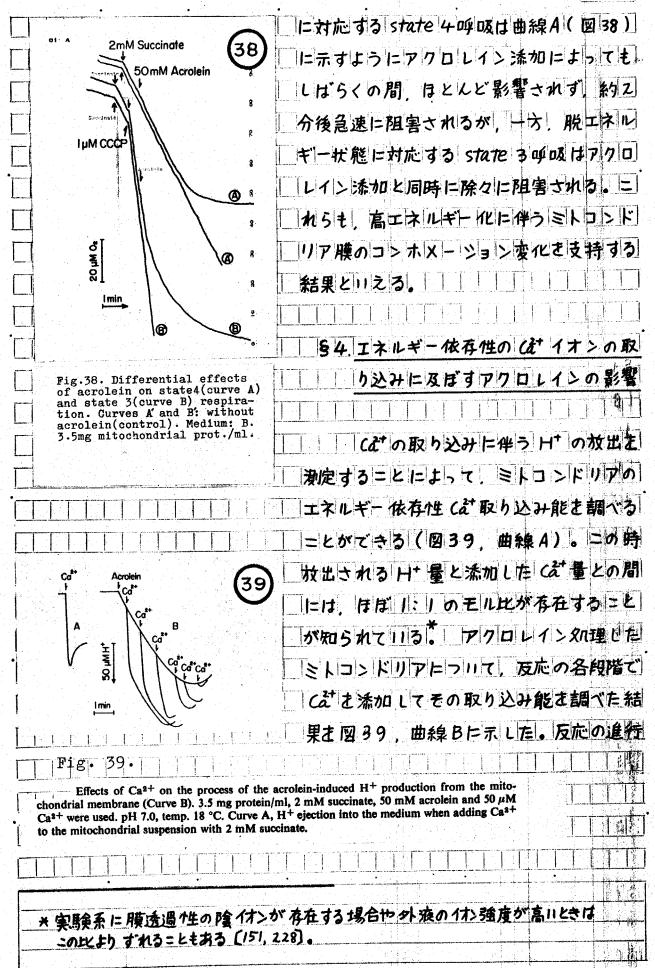


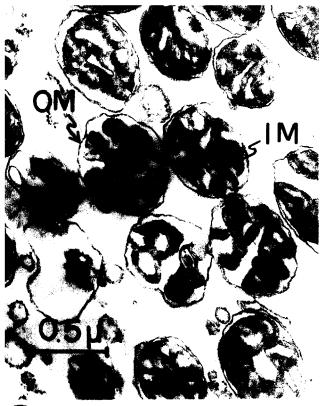
Fig.37. The phenomenon of respiratory control.

連系は呼吸基質の有無や酸素の有無、さらにはADPと別を取りなった状態で明まって異なった状態で明まって異なる状態で明まって異なる状態である。呼吸基質を表れる。呼吸基質を添加した状態をState 4とリリカル

*一般に respiratory control と呼ばれ、酸化的リン酸化の機構を解明するよざ 最も基本的な現象と考えられている(文献[227] およびその中の引用文献)。



とともにCat イオンの取り込み能は除々に阻害され、Ht の放出がみら なった時点で完全に阻害されることがわかる。 81の基礎実験をもとに、82~84ではHT放出の差異が反応性の差 異であるとみなして議論を進め、アクロレインとの反応の結果HTを放出する アミノ基は高エネルギー状態を代表していると推論した。しかしミトコンドリ アのような複雑な系では次のような可能性、例えば(i) 反応は高エネルギー 状態 脱工ネルギー状態ともに同程度進行しているが、後者の場合には疎水性 領域で反応が起きるため、外液中への HT 放出として観察されない。(前) アク ロレインが輸出よってエネルギー転移系と共役しているイオン透過系が活性化 された結果川中の放出として観察されているという可能性もあり、正確には反 応性成物の定量より反応量の差異を明らかにしなければならないが、発色固定 有しなリアクロレインの場合には反応物の定量は困難である。 そこで、従来よりアミノ基修飾試棄として知られているダンシルクロラ イドは用いてケイ光分析を試み」ミトコンドリアの高エネルギー状態と脱エネ における反応性の差異を確めようとしたのが以下の実験である。 2.ダンシルクロライドによるミトコンドリアの修飾 ダンジル化仁伴うミトコンドリアの形態変化 図40 图 に、ラット肝ミトコンドリアの典型的な電子顕微鏡写真世宗 矢印 OM. IM はそれぞれ外膜,内膜を示している。写真 图 で 示しれる 高江ネルギー状態のミトコンドリアにダンシルクロライドを作用させると 直图のような形態に変化する。ダンシル化によって内膜の構造が顕著に変化 し全体として少し膨潤していることがわかる。このような大きな形態変化は光 敗乱変化として、図41ののように分光学的にとらえることも可能である。 ニのニとよりダンシルクロライドはミトコンドリア膜を透過し内膜の内側式で達している。 ものと推定される。





A Rat Liver Mitochon.

B Dansylated

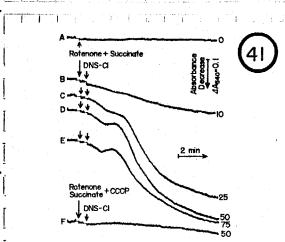


Fig.41. Dansyl chloride-induced absorbance change at 540 nm of mitochondria. Curve A: no addition of dansyl chloride. Curves B, C, D, and E: addition of $10 \,\mu\text{m}$, $25 \,\mu\text{m}$, $50 \,\mu\text{m}$, and $75 \,\mu\text{m}$ dansyl chloride to the respiring mitochondria. curve F: addition of CCCP to the respiring mitochondria following addition of $50 \,\mu\text{m}$ dansyl chloride (DNS-Cl). 20°C .

ダンシル化に伴うミトコンドリアの構造変化を 540mmの波長における吸光度変化 (AA540)で追跡した結果を図41に示した。曲線 B, C, D, E は高エネルギー状態のミトコンドリアに、それ、10、25、50、75μM ダンシルクロライドを反応させた場合の結果である。例えば、曲線 D と下の比較よりダンシル化に伴う形態変化は高エネルギー状態のミトコンドリア

に特異的な現象であることがあかる。ま

+ 63

*

た2段階の形態変化 (A4540, 例えば曲線D) がみられる = とも興味的 1=1と

高エネルギー状態のミトコンドリアとダンシルクロライドとの反応の途中で電子伝達系の阻害剤であるアンチマイツンAは添加しミトコンドリアを脱ロネルギー化した場合の吸光度変化 (&A540) に及ぼす影響を図 42 に示した。アンチマイツンの添加がはやければはや川ほど、その阻害効果も大き川上とが

Fig.42. Effect of antimycin A on the dansyl chloride-induced absorbance decrease. Curve A: without antimycin A. Curves B, C, and D: addition of $0.5~\mu M$ antimycin A at the points indicated by arrows. 20°C.

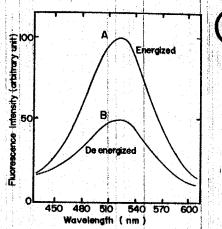


Fig. 43. Fluorescence spectra of dansyl chloride reacted with mitochondria. Curves B and A: 2 mm succinate, 2 μ m rotenone in the presence and the absence of 1 μ m CCCP. Fluorescence spectra of dansyl chloride reacted with mitochondria were measured after solubilizing and dialyzing the dansyl chloride-modified mitochondria.

[2	* 	1 >	: 11	アに	反点	E L 7	= 9	<u>ין ל</u> ו	ンル	71	コラ	1.	10	定		
[前節で	and the second				100							100	1 - 1	- [10 11 2
[にはべ]。 タン	シルノ	707	11/	: <i> =</i> .	よる	修創	市主	ゼリ	17	# [11	ار	اال	う	ع ا	đ.	T. Of	1
結果を示した	がり。こ	= 0 =	とす	確	める	Ed	1 = 1	反応	量。	n検	討。	主部	tə+	Æ.	图	43	がす
の結果である	が、身	官院!	-高=	にえ	ルギ	- 47	t能d	カオ	が	グン	الا	レル	اخا	41 †) वृ ।	1=	12/2
確められた。	現在,	ダン	12/11	14	され	左音	B位o	つ決	定 a	上精	カビ	ウド	進	x),	興	味本	3
実と見い出し	ष्ट्रांच	月31(考察	7 . P	49,国	44多	肥,) .						11			
									<u>I, </u>				Ţ	1	Ш	1	Ш
								<u> </u>			Π				IJ		
														-			
Marriago, and a service of the servi			Angelia and share or Armedel I	المختود المحد	and the second)	. arrangia arab arr				3			-		44	

: .	
	アクロレイン(CH2=CHCHO)は電子顕微鏡用試料の固定剤として用いら
	れているが、その際、固定液の PH低下が起こることが知られていた。上の点
	に着目してアクロレインが化学修飾試棄としても有用であることは示すことが
	できた。実験操作が簡単であり、かつ生理的条件下で行い得ることより、特別
	模系(生体内顆粒)の修飾に適していると思われる。 反応機構に関しては検討
٠	をかのえなかったが、オルムアルデヒド(HCHO)の場合に関してアミノ酸およ
	Uタンパク分子との反応が詳しく調べら水て113[229]ので参考になるでおろ
	う。「Florte's [199] はグルタルアルデヒド (OHCCH2CH2CH2CH0) まエネルギー
	状態の異なる種々のミトコンドリアに反応させ、膜蛋白質のイオン化の状態を
	深ぐろうとしているが、グルタルアルデビドはミトコンドリアによって酸化さ
	れるため望ましい修飾試棄とはいえない。二重結合を有するアクロレインは酸
	化されないニとが Packer ら[230]によって明らかにされている。蛋白分子中
	のアミリ夢とリン胎質中(ホスファチジルエタリールアミン、ホスファチジル
	セリン)のアミリ基がどのような割合で修飾されているかは興味ある問題であ
	るが、アクロレイン修飾した試料については行なわず、分析の容易なダンは肥
	(KILIたミトロンドリアの場合について進みつつある(次節参照)。
	電子伝達系の初期(例えば、コハク酸脱水素酵素の機能発現)には 5層
	基が重要な役割を果していることが知られている[231]。アクロレインは針
	墓とも反応することを示した(p39、表 皿)が、電子伝達系の阻害はこの SH
	基とアクロレインとの反応によるものと思われる。結果には示さなかったが。
	実際にアクロレイン修飾を受けたミトコンドリアでは DTNB によって検出さ
	れるSH基は減少していることが確められた。
	エネルギー転移反応はミトコンドリア内膜中で起っており、特にATE
	の合成に関与すると考えられる日、分子が内膜のマトリックス側(ア4、四年)
./	

旧あることより修飾試薬が膜にとけ込み内側まで到達できることが必要である。 従って、用いる試薬がある程度脂溶性であることが1つの重要な要素であると 思かれる。本研究で用いたアクロレイン、ダンジルクロライドをはじめ最近の 親告にある修飾試棄は大部分脂溶性である。もちるん、膜の外側表面の計志修 飾するためには膜を透過できない高分子物質ないしは水溶性の試薬を用りる必 要がある。最近、光化学反応を利用する修飾法[14617211]および反応生成物の判 ケイ光は有する修飾試薬が開発された[226,232,23]。に水らによって今後ますます 興味ある知見がもたらされるものと思かれる。 ミトコンドリアのダンジル化 ダンンルクロライドはケイ光分析が可能であるため蛋白質化学の研究を 欠くことのできない試棄となっている[222, 222]。修飾試棄としての友にを も十分に調べられてあり、ISH墓およびプロトネーションして川なリアを野童 (+NH1)と容易に反応することが知られている(条件によってはヒスタンツの チロンンの OH 基とも反応する)。アミリ基との反応性成物 は強酸性下でも安定であるが、対象は N(CH.). N(CH.). ル分子中のジメチル化されたアミノ蓮 がプロルネーションした状態(軟件) ではけ1光を発しない[234]ので注 **魔が必要である。上図にこの様子は示した。** ミトコンドリアにダンツルクロライドを作用させた時、高エネルギー状 態と脱エネルギー状態で反応性に大きな差異が認められたまとより、ダンシル 化によってミトコンドリアのどの成分のどの残基が修飾されたかま明らかは毎 |3||とは高エネルギー状態の実体を解明する上で極めて興味あることであり時 左検討中であるが、SH墓とアミリ墓が修飾されていることが確められた。 * DTNB (5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid); SH其と反応する), TNBS (trinitrobenzene sulfo nate; NH2基と反応)で未反応のSH基,アミノ基本調べ算出した。他の形基にフリでは未検討

「SIH墓は電子伝達系、エネルギー転移系をはじめとして、川ン酸イオンの膜透過(IPi Carrier**)や K+ イオンの輸送(K+ carrier***)にも重要な役割を果して川ることが知られて川る。ダンシルルの途中で観察されたス段階の吸光度、変化(IP 46、図 42)のうち最初の小さな変化が、(i) アンチマイシン添加により回復すること、すなから可逆的であること、および(ii) ミトコンドリア 懸濁液のイオン組成に強く依存することより、上述したイオン透過に伴うミトコンドリアの形態変化とも考えられ、解析を追ぶて川る。

| 図42 (p46) に示された2段階目の大きな吸光度変化につけては、アミノ墓の反応に基づくものではなりかと推定している。この場合修飾されるものとしては、蛋白分子中のアミノ墓とリン脂質(ホスファチンルエタノナル及

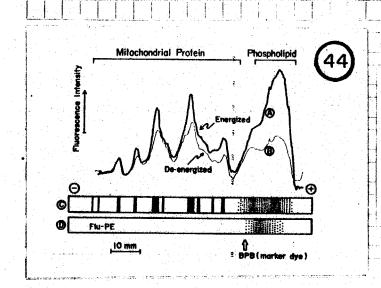


Fig.44.

SDS gel electrophoresis of dansylated mitochondria. Curve A: a densitometric trace(fluorescence pattern) of dansylated energized mitochondria, curve B: dansylated deenergized mitochondria. C: the SDS gel electrophoresis pattern of dansylated energized mitochondria. D: the SDS gel electrophoresis pattern of fluorescamine-treated phosphatidylethanolamine.

|ミン||中のアミリ基が考えられるが、予備的な実験によれば上図44に示すま||うに、リピドがかなりの割合で修飾されていることがわかった。SDS ディ
|ク電気泳動法によって蛋白質のみならずリン脂質の分析も可能であることは、||すでにCarraway||ら[235]] によって報告されている。|リピドの修飾により膜構造が大きく変化するにとは容易に想像できる[162]。また、リン脂質はエ|||水ルギー転移系にとっても欠くことのできない存在であることも示されてあり

^{*}アクロレインの工員参照。ただしダンジルクロライドの場合は50μM(50μmoles 1g番白)でも電子伝達は阻害されなかった。

^{**} P: carrier (リン酸キャリア-)は SH基の修飾によって失活する [236]。

^{***} SH基の修飾によってK+透過が促進される[173]。

	50
[237-218] 前頁の図44は興味ある結果といえる。 SDS ディス	ク電気泳動パ
ターン上の各バンドがミトコンドリア膜成分の向に対応するかと	いう帰属と同
定が現在盛んに進められつつある[240-242]。近川将来!	上記の171光
スキャンニシグ(四44)結果のうち蛋白質部分のピークの帰属	が可能になれ
ば一歩進んだ知見が得られるものと思かれる。	
.	17 M 1 M 2 M 2 M 2 M 2 M 2 M 2 M 2 M 2 M 2
りミトコンドリアの高エネルギールに伴うコンポスーツョン変化	
リピドの関与は推定した。エネルギー転移系にあける大きなコン	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
変化を証明した他の例としては Jagendorf らし219 Jの仕事がる	
葉緑体をトリチウム水(3H2O)中に懸濁し、光照射後、EDTAIS	
緑体膜がらATPase を分離し、トリチウム化された量を調べ、	M (A)
あいたコントロールのものと比較することにより、ATPase 分	
構造変化が起きていることを明らかにした。葉緑体やミトコン	the state of the s
ATPase 分子はATP合成の直接の担い手*と考えられている。	
* reversible ATPase - ATP symthetase complex	

				The second secon	
[要旨				
	ンドリアは細	胞内における	うエネルギー	産生の場では	おり、生命現象
I=ツ要な ATP	の大部分と	作り出して	いる。その内	膜にはエネリ	レギー変換に関
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			1.0		な難したエネル
					ル現象の発見は 研究ではミトコ
ンドリアにお	けるエネルギ	一变换過程	の初期にみら	れるミトロ	ンドリア膜の高
					化学修飾法によ
					ギー状態のミトー 差異のあること
を明らかにし	た。さらに、	高エネルギ	- 化の裏面と	して重視さ	れてきた脱工祭
ルギー化の機	والمرابع والم والمرابع والمرابع والمرابع والمرابع والمرابع والمرابع والمراب	,除共役削	の作用機作に	関しても興	味ある結果出得
		によるミト	コンドリア艀	内電荷の探	煮(正章)
. ローダミン	6日の水溶液	にチトラフ	ェニルボロン	,ペンタク	007=11+10
					マクトルの変化 よっても二批ビ
		grand the grand of the control of th			Gが膜内電荷探

るにとができた。

(1) 陽イオン性色素によるミトコンドリア膜内電荷の探索(工庫)

(1) 陽イオン性色素によるミトコンドリア膜内電荷の探索(工庫)

などの脂溶性アニオンを添加すると落しい吸収およびケイ光スペクトルの変化が起こる。基質添加によるミトコンドリアの高エネルギー化によっても二礼と

類似したスペクトル変化が観察されることより。ローダミン6.6が膜内電荷探

広試薬として有用であることを見い出した〔817]。ピナツアノールもローダミン6.6 と似た学動を示す〔127。ニれらカチオン性色素とミトコンドリアの相

を作用を検討した結果。ローダミン6.6 などの脂溶性カチオンはミトコンドリアの相

を作用を検討した結果。ローダミン6.6 などの脂溶性カチオンはミトコンドリアの相

を作用を検討した結果。ローダミン6.6 などの脂溶性カチオンはミトコンドリアの高エネルギー化に伴い膜に結合してその吸収およびケイ光スペクトルに変

化し、阻害剤添加による脱エネルギー化とともに遊離したのスペクトルにもと

ることが明らかになった。このエネルギー状態に依存したカチオン性色素の応

陸の差異は、膜内電荷近傍の大きなコンオメーション変化を反映している性の

と権定される

																	Security (The Control of the Co				
				· - T					<u>'</u>	·	, 1	• -	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		 نام - سا	:- '			: ! !		• 1				•			53
		<u>1</u> F					헭	#	丰		.l			!						T								
						1=	あ	たり	良			100					٠.									- 1	- III 3	び本
																					12	1	1.0				31 + 3	事に
,									才泰	活	无	生	お	I	び	4:	漫	明-	<u>}- </u> =	512	の	助	5 {	< T	み <i>力</i> -	٤	得	档。
あれ	<u>।</u>	- 54	更	Z 73	<u>کا ل</u>	J.J.	9 	•			<u> </u>	1 T	L		!! 						J T	! ! 	<u>_</u>	_! _		<u> </u>		
	T	<u> </u>	/! 		<u> </u>		!			'	 T	! 	!! 		!! 			'			<u></u>	<u>' '</u> 				1		
]												1									Π						
								Ī		T	Ī_			<u> </u>		104 BA 000				1				1		Ţ		
				1	1							Ľ,								T				1		I		
					<u> </u>	L								<u> </u>														
		<u>. </u>	<u> </u>		<u> </u>	<u> </u>			<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	 	<u> </u>		<u> </u>				_ -	1				1		
					<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>		<u></u>	_ <u> </u> 	<u> </u>	<u> </u>	<u>I.</u> T	! 		L	<u>l</u> 	l		_ <u></u>	 T	1 7				I T		 • *
! 	_!_]		<u>I</u>			J T_	 	! _ ! 	_ <u>_</u>	<u></u> -	<u> </u>	<u>'</u> 	<u> </u>	<u> </u>			1 			<u></u> -	<u>-</u> !			! T		- <u> </u> -		1113
	'- 	1						' <u>'</u> 			Ţ		I											I		1		
					1		L							<u> </u>	T		Ė	Ù		1	1							
			T			L				1		1	<u> </u>						Ι		<u>T</u>]	Ш	
	T				I	Γ			<u>I</u>		1_															<u>.</u>		
							<u> </u>				_ _			<u> </u>	<u> </u>		<u> </u>				<u> </u> 	<u> </u>				<u> </u>		1 1 _
			<u> </u>		<u> </u>	<u></u>	.				<u> </u> -	<u> </u>	<u> </u>		<u> </u>					_ _	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u> 	<u> </u>		1		
	<u> </u>	1	1	! <u> </u>	<u> </u>	<u>J</u> T						 T	<u>. 1 </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	1 T	! 		<u> </u>		1- T	!	<u> </u>	<u>i</u>	+		
		<u> </u>	<u> </u>	<u> </u> 		<u>-</u> -	1	! 	\ T	-!-	<u> </u>	1	<u>'</u>	<u>'</u> T	' T	\						İ						
	!_ 		-\- 	<u>''</u> -								I					T											
							T								I.		Ι							_]		1		
					4			•																	.,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,			**
-) (A)			1												-									1
								•					1	-								- 1						
											•					• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •												

v. REFERENCES 引用文献

- 1 Lehninger, A.L.(1964) The Mitochondrion, pp.1-13, Benjamin, New York
- 2 Palmar, J.M. and Hall, D.O.(1972) in Progress in Biophysics and Molecular Biology(Butler, J.A.V. and Noble, D., eds), Vol. 24, pp.127-176
- 3 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕造 (1971) ミトコンドリア, PP. 1-21, 南江堂
- 4 Cowdry, E.W.(1918) Contrib. Embryol. 8, 39
- 5 Porter, K.R. and Novikoff, A.B. (1974) Science 186, 516-519
- 6 Slater, E.C.(1971) Q. Rev. Biophys. 4, 35
- 7 Lardy, H.A. and Furguson, S.M. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 991-1034
- 8 van Dam, K. and Meyer, A.J.(1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 115-160
- 9 小沢高将(1972)蛋白質·核酸·酵素 17,341-352
- 10 佐藤信紘, 萩原文=(1972)蛋白質·核酸·酵素 17,915-926
- 11 香川蜻雄 (1973) 化学 28,497-505. b) 村岡三郎, 寺田弘 (1973)蛋白質·核酸·酵素 18
- 12 稻田祐二(1973)蛋白質·核酸·酵素 18.702-709
- 13 山内脩(1974)化学增刊 61,161-177;b)高木雅行(1973)化学增刊 59,151-176
- 14 Racker, E.(1970) in Essays in Biochemistry(Campbell, P.N. and Dickens, F., eds), Vol. 6, pp.1-22, Academic Press, London
- 15 Green, D.E. and Baum, H.(1970) Energy and The Mitochondrion, Academic Press, New York
- 16 Florkin, M. and Stotz, E.H., eds(1966) Comprehensive Biochemistry Vol. 14, American Elsevier Pub. Co., New York
- 17 Lehninger, A.L.(1965) Bioenergetics, W.A. Benjamin, Inc., New York
- 18 Racker, E.(1965) Mechanisms in Bioenergetics, Academic Press, New York
- 19 Azzone, G.F., Carafoli, E., Lehninger, A.L., Quagliariello, E. and Siliprandi, N., eds(1972) Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes, Academic Press, New York and London
- 20 Ernster, L., Estabrook, R.W. and Slater, E.C., eds(1974)
 Dynamics of Energy-Transducing Membranes, Elsevier, Amsterdam
- 21 Racker, E., ed(1970) Membranes of Mitochondria and Chloroplasts, Van Nostrand Reinhold Co., New York

- 22 Ernster, L. and Drahota, Z., eds(1969) Mitochondria-Structure and Function, Academic Press, London and New York
- 23 Slater, E.C., Kaniuga, Z. and Wojtczak, L., eds(1967) Biochemistry of Mitochondria,
- 24 萩原文ニ編(1971)ミトコンドリア、朝倉書店; b) 生体膜(1971)蛋白質・核酸・酵素 16,9号(増刊)
- 25 Harmon, H.J., Hall, J.D. and Crane, F.L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 344, 119-155
- 26 Fessenden-Raden, J.M. and Racker, E. (1971) in Structure and Function of Biological Membranes (Rothfield, L.I., ed), pp. 401-438
- 27 Packer, L.(1972) J. Bioenergetics 3, 115-127
- 28 Klingenberg, M.(1970) in Essays in Biochemistry(Campbell, P.N. and Dickens, F., eds), Vol. 6, pp.119-159
- 29 Egan, R.W. and Lehninger, A.L.(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 195-201
- 30 Hatase, O. and Oda, T.(1973) in Organization of Energy-Transducing Membranes (Nakao, M. and Packer, L., eds), pp.355-367, University of Tokyo Press, Tokyo
- 31 Blondin, G.A.(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 97-105
- 32 Pressman, B.C.(1970)in Membranes of Mitochondria and Chloroplasts (Racker, E., ed), pp.213-250, Van Nostrand Reinhold, New York.
- 33 Moore, C.L. and Pressman, B.C.(1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 562-567
- 34 Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H. and Waring, M.J.(1972) The Molecular Basis of Antibiotic Action, Wiley, London
- 35 Moore, C.L.(1971) in Current Topics in Bioenergetics(Sanadi, D.R. ed), Vol. 4, pp.191-236, Academic Press, New York and London
- 36 Slater, E.C.(1953) Nature 172, 975-978
- 37 Greville, C.D.(1969) Current Topics in bioenergetics 3,1-78
- 38 Wang, J.H.(1970) Science 167, 25-30
- 39 Painter, A.A. and Hunter, F.E. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 387-395
- 40 Falcone, A.B. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 56, 1043-1046
- 41 Bauerlein, E. and Wieland, T.(1970) Chem. Ber. 103, 648-651
- 42 Boyer, P.D., Bieber, L.L., Mitchell, R.A. and Szabolssi, G. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5384-5390

- 43 Penniston, J.T., Harris, R.A., Asai, J. and Green, D.E. (1968)
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 59, 624-631
- 44 Hackenbrock, C.R. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 61,598-605
- 45 Green, D.E. and Ji, S.(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69, 726-729
- 46 Green, D.E. (1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 27-78
- 47 Boyer, P.D. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 2837
- 48 Mitchell, P.(1961) Nature 191, 144-148
- 49 Kagawa, Y. (1972) Biochim. Biophys. Acta 265, 297-338
- 50 Hinkle, P.C. (1973) Fed. Proc. 32, 1988-1992
- 51 Racker, E. and Stoeckenius, W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 662-663
- 52 Drachev, L.A., Jasaitis, A.A., Kaulen, A.D., Kondrashin, A.A., Liberman, E.A., Nemecek, I.B., Ostroumov, S.A., Semenov, A.Y. and Skulachev, V.P.(1974) Nature 249, 321-324
- 53 Chance, B. and Mela, L. (1966) Nature 212, 369-372
- 54 Pressman, B.C.(1972) in Biochemistry and Biophysics of Mitochon-drial Membranes(see ref. 19), pp.591-602
- 55 McPhee, J. and Brody, S.S. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 50-53
- 56 Komai, H., Hunter, D.R. and Takahashi, Y.(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 82-89
- 57 a) Cole, J.S.III and Aleem, H.(1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 3571-3575 b) Forte, G., Rosa, L. and Garlaschii, F.(1972) FEBS Lett. 27, 23-26
- 58 Slater, E.C. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 317-326
- 59 Tupper, J.T. and Tedeschi, H.(1969) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 63, 370-377, 713-717
- 60 Tupper, J.T. and Tedeschi, H.(1969) Science 166, 1539-1540
- 61 Puskin, J.S. and Gunter, T.F. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 797
- 63 Weber, N.E. and Blair, P.V.(1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 821-829
- 64 Stoner, C.D. and Sirak, H.D.(1973) J. Cell Biol. 56, 51-64
- 65 Klingenberg, M. and Scherer, B. (1974) Biochemistry 13, 161-170

- 66 Hsu, M. and Chan, S.I. (1973) Biochemistry 12, 387; 13, 362(174)
- 67 Azzi, A., Bragadin, M.A., Tamburro, A.M. and Santato, M.(1973) J. Biol. Chem. 248, 5520-5526
- 68 Chen, W.L., Wong, L.T., Long, R.A. and Kalow, W.(1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 1273-1279
- 69 Azzi, A., Cherardini, P.L. and Santato, M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2035 -2042
- 70 Skulachev, V.P.(1991) Current Topics in Bioenergetics 4, 127-190
- 71 Massari, S., Dell'Antone, P., Colonna, R. and Azzone, G.F. (1974) Biochemistry 13, 1038-1043
- 72 Azzi, A., Fabbro, A., Santato, M. and Gherardini, P.L.(1971) Eur. J. Biochem. 21, 404-410
- 73 Eilermann, L.J.M.(1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 231 -233
- 74 Lee, C.P.(1971) Biochemistry 10, 4375; Fed. Proc.(1974)33, 1289
- 75 Kraayenhof, R.(1970) FEBS Lett. 6, 161-165
- 76 Kraayenhof, R.(1973) in Fluorescence Techniques in Cell Biology (Thaer, A.A. and Sernetz, M., eds), pp.381-394
- 77 Azzi, A. and Vainio, H.(1971) in Probes for Membrane Structure; and Function(Chance, B., Lee, C.P. and Yonetani, T., eds), pp.209-218
- 78 Gitler, C., Rubalcava, B. and Caswell, A.(1969) Biochim. Biophys. Acta 193, 479 -481
- 79 Azzi, A. and Santato, M.(1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 211-217
- 80 Colonna, R., Massari, S. and Azzone, G.F. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 577-585
- 81 Yaginuma, N., Hirose, S., and Inada, Y.(1973) J. Biochem. 74, 811-815
- 82 Hirose, S., Yaginuma, N. and Inada, Y. (1974) J. Biochem. 76, 213-216
- 83 Grinius, L.L., Jasaitis, A.A., Kadziauskas, Y.P., Liberman, E.A., Skulachev, V.P., Topali, V.P., Tsofina, L.M. and Vladimirova, A. (1970) Biochim. Biophys. Acta 216,1-21
- 84 Jasaitis, A.A., Nemecek, I.B., Severina, I.I., Skulachev, V.P. and Smirnova, S.M.(1972) Biochim. Biophys. Acta 275, 485-490
- 85 Azzi, A. and Santato, M.(1972) FEBS Lett. 27, 35-38
- 86 Nordenbrand, K. and Ernster, L.(1971) Eur. J. Biochem. 18, 258-273. b) "The effect of TPB" on energy-linked reactions in spinach chloroplasts(1973) Biochim. Biophys. Acta 325, 230 m.

- 87 Freedman, R.B., Hancock, D.J. and Radda, G.K.(1971) in Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes (Chance, B., Lee, C.P. and Blasie, J.K., eds), Vol.1, pp.325-338
- 88 Datta, A. and Penefsky, H.S.(1970) J. Biol. Chem. 245, 1537 -1544
- 89 Radda, G.K.(1971) Biochem. J. 122, 385-396
- 90 Radda, G.K.(1971) Current Topics in Bioenergetics 4,81-126
- 91 Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y.(1963) J. Cell Comp. Physiol. 62, 9-16; Cormier, M.J., Hori, K. and Anderson, J.M.(1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 137-164
- 92 Chance, B., Azzi, A., Lee, I.Y., Lee, C.P. and Mela, L.(1969) FEBS Symposium, Vol. 17, pp. 233-273 (ref. 22)
- 93 Harigaya, S. and Schwartz, A.(1973) in Organization of Energy-Transducing Membranes (Nakao, M. and Packer, L., eds), pp.117-126, University of Tokyo Press
- 94 Coulson, A.F.W. and Yonetani, T.(1971) Fed. Proc. Abstr. No. 529
- 95 Caswell, A.H. and Hutchison, J.D.(1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 43-49; Caswell, A.H. and Warren, S.(1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1757-1763
- 96 Chance, B. and Mela, L. (1966) Nature 212, 369-372
- 97 Brierley, G.P., Jurkowitz, M., Scott, K.M. and Merda, A.J. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 545-556. b) Colonna, R., Dell'Antone, P. and Azzone, G.F. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 151, 295-303
- 98 Brocklehurst, J.R., Freedman, R.B., Hancok, D.J. and Radda, G.K.(1970) Biochem. J. 116, 721-731
- 99 Hirose, S., Yaginuma, N. and Inada, Y. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 152, 36-43
- 100 Penefsky, H.S. and Chang, T-M.(1974) J. Biol. Chem. 249, 1090-1098
- 101 Slater, E.C. et al. (1973) Biochim. Biophys. Acta 305, 508
- 102 Reed, P.W. and Lardy, H.(1972) J. Biol. Chem. 247, 6970-6977
- 103 Case, G.D., Venderkooi, J.M. and Scarpa, A.(1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 174-185
- 104 Lee, C.P.(1973) in Mechanisms in Bioenergetics (Azzone, G.F., Ernster, L., Papa, S., Quagliariello, E. and Siliprandi, N., eds), pp.115-126
- 105 Astle, L. and Cooper, C.(1974) Biochemistry 13, 154-160

- 106 Jasaitis, A.A., Kuliene, V.V. and Skulachev, V.P.(1971) Biochim. Biophys. Acta 234, 177-181
- 107 Loomis, W.F. and Lipmann, F. (1948) J. Biol. Chem. 173, 807-808
- 108 Lardy, H.A. and Wellman, H.(1953) J. Biol. Chem. 201, 357-370
- 109 Chance, B. and Williams, G.R.(1956) Advan. Enzymol. 17, 65-134
- 110 Hemker, H.C.(1964) Biochim. Biophys. Acta 81, 9-20
- 111 Weinbach, E.C. and Garbus, J.(1969) Nature 221, 1016-1018
- 112 Wang, J.H.(1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 58, 37-44
- 113 Mitchell, P.(1966) Biol. Rev. 41, 445-502
- 114 van Dam, K. and Kraayenhof, R.(1969) in The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria(Papa,, S., Tager, J.M., Quagliariello, E. and Slater, E.C., eds), p.299, Adriatica Editrice, Bari
- 115 van Dam, K. and Slater, E.C. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 58, 2015-2019
- 116 Mitchell, P. and Moyle, J. (1967) Biochem. J. 104, 588-600
- 117 Hopfer, U., Lehninger, A.L. and Thompson, T.E. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 59, 484-490
- 118 Liberman, E.A., and Topaly, V.P. (1968) Biochim. Biophys. Acta 163, 125-136
- 119 Liberman, E.A., Topaly, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A. and Skulachev, V.P.(1969) Nature 222, 1076-1078
- 120 Bangam, A.D., Hill, M.W. and Miller, N.G.A.(1974) in Methods in Membrane Biology(Korn, E.D., ed), Vol.1, pp.1-68
- 121 Blok, M.C., de Gier, J. and van Deenen, L.L.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 367, 202-224
- 122 Cunarro, J. and Weiner, M.W. (1973) Nature 245, 36-37
- 123 Wilson, D.F., Ting H.P. and Koppelman, M.S.(1971) Biochemistry 10, 2897-2902
- 124 Muraoka, S. and Terada, H.(1972) Biochim. Biophys. Acta 275, 271-275

1.9

- 125 Wang, J.H. and Copeland, L.(1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 64-72
- 126 Hanstein, W.G. and Hatefi, Y.(1974) J. Biol. Chem. 249, 1356-1362

- 127 Hanstein, W.G. and Hatefi, Y.(1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71, 288-292
- 128 Hunter, D.R., Komai, H. and Haworth, R.A. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 647-653
- 129 Hunter, D.R. and Capaldi, R.A.(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 623-628
- 130 Kaback, H.R., Reeves, J.P., Short, S.A. and Lombardi, F.J. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 160, 215-222
- 131 Kobayashi, Y. and Nishimura, M. (1973) J. Biochem. 74, 1233-1238
- 132 Pullman, M.E., Penefsky, H.S. and Datta, A., Racker, E. (1960) J.Biol Chem. 235, 3322-3329
- 133 Allison, W.S. and Benitez, L.V.(1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69, 3004-3008
- 134 Cantley, L.S., Jr. and Hammes, G.G. (1973) Biochemistry 12, 4900
- 135 Greville, G.D. and Reich, E. (1956) Biochim. Biophys. Acta 20, 440 -442
- 136 広瀬茂久(1972) 修士論文, 東京工業大学, 化学科
- 137 Layne, E.(1957) in Methods in Enzymology(Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds), Vol. 3, p. 450, Academic Press, N.Y.
- 138 Papa, S. and Paradies, G.(1974) Eur, J. Biochem. 49, 265-274 b) McGivan, J.O. and Klingenberg, M.(1971) Eur. J. Biochem. 20, 392 139 Mitchell, P. and Moyle, J.(1969) Eur. J. Biochem. 7, 471-484
- 7.40 G G and Gamestia D (3060) Amph
- 140 Carafoli, E., Rossi, C.S. and Gazzotti, P.(1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 527-537
- 141 Saito, T., Hirose, S., Okada, M. and Inada, Y. in preparation.
- 142 Lehninger, A.L.(1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1744-1748
- 143 Azzone, G.F., Colonna, R. and Dell'Antone, P.(1972) in Ref.19, pp.277-292
- 144 Green, D.E. and Warton, D.C. (1963) Biochem. Z. 338, 335-348 (see Ref. 25)
- 145 Slater, E.C.(1974) in Ref. 20(BBA Library 13), pp.1-20
- 146 树沼仲次(1973)修士論文, 東京工業大學, 化学科
- 147 Gear, A.R.L.(1974) J. Biol. Chem. 249, 3628-3637
- 148 Bouni, A., Luciani, S. and Conttessa, A.R. (1964) Nature 201, 1219-1220
- 149 Henderson, P.J.F. and Lardy, H.A.(1970) J. Biol. Chem. 245, 1319; Klingenberg and Buchholz(1973) Eur. J. Biochem. 38, 346-358

- 150 八木园夫, 吉田姜一, 太幡和一 (1958) 螢光, 內77, 南江堂
- 151 Reynafarje, B. and Lehninger, A.L. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 286-292
- 152 Papa, S., Guerrieri, F., Simone, S. and Lorusso, M.(1973) in Mechanisms in Bioenergetics(Azzone, G.F., Ernster, L., Papa, S., Quagliariello, E. and Siliprandi, N., eds), pp.451-472
- 153 Brierley, G.P., Jurkowitz, M., Merola, A.J. and Scott, K.M. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 152, 744-754
- 154 Snoswell, A.M. (1966) Biochemistry 5, 1660-1666
- 155 Hatase, O. and Oda, T.(1971) J. Biochem. 70, 549-556
- 156 Weiner, M.W. and Lardy, H.A. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 568-577
- 157 Kovac, L.(1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 101-135
- 158 Griffiths, D.E., Avner, P.R., Lancashire, W.E. and Turner, J.R. (1972) in Ref. 19, pp.505-521
- 159 a) Bretscher, M.S.(1972) Nature New Biol. 236, 11-12 b) Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D. and van Deenen, L.L.M.(1973) Biochim. Biophys. Acta 323, 178-193
- 160 Singer, S.J. and Nicolson. G.L.(1972) Science 175, 720-724; Nicolson, G.L. and Painter, R.G.(1973) J. Cell Biol. 59, 395-406; Harris, H., Sidebottom, E., Grace, D.M. and Bramwell (1969) J. Cell Sci. 4, 499; Bretscher, M.S.(1973) Science 181, 622-629; Berlin et al.(1974) Nature 247, 45-46
- 161 Racker, E.(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 224
- 162 Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B. and Colley, C.M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 159-182
- 163 Cox, G.B. and Gibson, F.(1974) Biochim. Biophys. Acta 346, 1-25
- 164 赤松穣,浅野朗,安聚泰宏,大村恒雄,藤田道世,水凰昭二(1974)生体膜実験法(上,下)(蛋白質、核酸、酵素別冊)
- 165 大西堅为編(1967) 生体膜実験技術,南江堂

化型 (1973) No 8

- 166 柴田和雄(1969)高次構造の化學的研究法,東出版会
- 化学(1974) No 10, p819
- 167 Vallee, B.L. and Riordan, L.F. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38 733-794
- 168 Shibata, K.(1971) in New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis (Niederweiser, A. and Pataki, G., eds), pp.341-385, Ann Arbor Sci. Publ. Inc.
- 169 Means, G.E. and Feeney, R.E.(1971) Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, Inc., San Francisco

- 170 Hirose, S., Tamaura, Y., Iida, K. and Inada, Y.(1973) Biochim. Biophys. Acta 305, 52-58
- 171 Maddy, A.H.(1964) Biochim. Biophys. Acta 88, 390-399
- 172 Khanwala, A.S. and Kasper, C.B.(1971) Biochim. Biophys Acta 233, 348
 - 173 Scott, K.M., Knight, V.A., Brierley, G.P. (1970) Biochemistry 9, 714-722 Green, D.E. (1994) J. Biol. Chem. 249, 678-681. c) Diwan, J.J. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. , 384
 - 174 Siekevitz, D. and Palade, G.E. (1966) J. Cell Biol. 30, 73-117
 - 175 Slater, E.C.(1961) Pro. Intern. Congr. Biochem. 5th (Moscow), pp.378-384
 - 176 Sabadle-Pialoux, N. and Gautheron, D. (1971) Biochim. Biophys. Acta 234, 9
 - 177 Marinetti, G.V., Sheeley, D.S., Baumgarten, R. and Love, R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 502-507
 - 178 Okada, M., Hirose, S., Tamaura, Y., Yamazaki, S., Ushiwata, A., Nakamura, Y. and Inada, Y.(1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 316-319
 - 179 Takenaka, O., Sakai, T., Yora, T. and Inada, Y.(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 742-748
 - 180 Schmidt-Ullrich, R., Knuferman, H. and Wallach, D.F.H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 307, 353-365. (cf. BBRC 51('73) 666)
 - 181 Hirose, S., Yamashita, K. and Shibata, K. (1971) Plant and Cell' Physiol. 12, 775-779
 - 182 Miyahara, M. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 134, 590-596
 - 183 Guerin, B., Guerin, M. and Klingenberg, M. (1970) FEBS Lett. 10, 265-268
 - 184 Palmieri, F., Passarella, S., Stipani, I. and Quagliello, E. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 195-208
 - 185 Senior, A.E.(1973) Biochemistry 12, 3622
 - "Fluorescent labeling of cholinergic receptor"(1973)
 Biochemistry 12, 4855
 - 187 Gupta, U.D. and Rieske, J.S.(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1247-1254
 - 188 Giaquinta, R.T., Dilley, R.A., Selman, B.R. and Anderson, B.J. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 200-214. (JBC249,2873)
 - 189 Beechey, R.B., Robert, A.M., Holloway, C.T. and Knight, I.G. (1967) Biochemistry 6, 3867; Cattell, K.J., Lindop, C.R., Knight, I.G. and Beechey, R.B.(1971) Biochem. J. 122, 66P
 - 190 Slater, E.C. and Welle, H.F.T.(1969) in Inhibitors-Tools in Cell Research(Bücher, Th. and Sies, H., eds), pp.258-278, Springer-Verlag, Berlin. b) Garland, P.B., Clegg, R.A., Light, P.A. and Ragan, C.I.(1969) in Ref. 190, pp.217-246.

- 191 Kalra, V.K. and Brodie, A.F.(1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 653-659. b) Altendorf, K., Halold, F.M. and Simari, R.D. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4587-4593
- 192 Nakaya, K., Ariga, K., Haraguchi, T. and Nakamura, Y.(1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 364-372
- 193 Nakaya, K., Ariga, K., Obata, F. and Nakamura, Y.(1972) J. Biochem. 71, 559
- 194 McCarty, R.E. and Fagan, J.(1973) Biochemistry 12, 1503-1507 b) McCarty, R.E., Pittman, P.R. and Tsuchiya, Y.(1972) J. Biol. Chem. 247, 3048-3051
- 195 Brunswick, D.J. and Cooperman, B.S. (1973) Biochemistry 12, 4074-4078. (PNAS 70('73)3344)
- 196 Lee, M.J., Harris, R.A. and Green, D.E. (1969) Biochem.
 Biophys. Res. Commun. 36, 937-946
- 197 Southard, J.H., Blondin, G. and Green, D.E. (1970) J. Biol. Chem. 249, 678-681. (cf.Anal. Biochem. 9('64)100)
- 198 Bretscher, M.S.(1971) J. Mol. Biol. 58, 775-781; 59, 351-357
- 199 Fortes, P.A.G.(1971) in Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes (Chance, B., Lee, C.P. and Blasie, J.K., eds), Vol.1, pp.279-282, Academic Press
- 200 Gamberg, C.G. and Hakomori, S.(1973) J. Biol. Chem. 248, 4311-4317
- 201 Rifkin, D.B., Compus, R.W. and Reich, E.(1972) J. Biol. Chem. 247, 6432 -6437
- 202 a) Phillips, D.R. and Morrison, M.(1971) Biochemistry 10, 1766 b) Marchalonis, J.J., Cone, R.E. and Santer, V.(1971) -1771 Biochem. J. 124, 921 -927
- 203 Datta, D.B., Ryrie, I.J. and Jagendorf, A.T. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4404-4411
- 204 "Comparison of the effects of 2-phenylindolone and NEM on energy-linked reactions in submitochondrial particles"(1973)

 Biochem. Soc. Transactions 1, 410
- 205 "Acceleration of thiol-induced swelling of rat liver" mitochondria by selenium"(1973) Biochemistry 12, 4586
- 206 Cuatrecasas, P.(1973) Federation Proc. 32, 1838-1846
- 207 Siliprandi, D., DeMeio, R.H., Toninello, A. and Zoccarato, F. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1071-1075. b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55(1973)563
- 208 Berg, H.C.(1969) Biochim. Biophys. Acta 183, 65-78
- 209 Bender, W.W., Garan, H. and Berg, H.C.(1971) J. Mol. Biol. 58, 783-797
- 210 Schneider, D.L., Kagawa, Y. and Racker, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4074-4079

1 1 61 7

- 211 Staros, J.V. and Richards, F.M. (1974) Biochemistry 13, 2720-2726
- 212 Kuylenstierna, B., Nicholls, D.G., Hovmöller, S. and Ernster, L. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 419-426. (BBA 292('73)566)
- 213 Selman, B.R., Bannister, T.T. and Dilley, R.A.(1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 566-581
- 214 Wang, J.H., Yamauchi, O., Tu, S-I., Wang, K., Saunders, R.D. and Copeland, L.(1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 785
- 215 Wang, J.H. and Copeland, L.(1974) Arch. Biochem. Biophys. 162, 64-72
- 216 McCarty, R.E. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 161, 93-95
- 217 Nicolson, G.L. and Painter, R.G.(1973) J. Cell Biol. 57, 373
- 218 Coleman, R.(1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 1-30
- 219 Ryrie, I.J. and Jagendorf, A.T. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4453-4459
- 220 Fields, R.(1972) in Methods in Enzymology(Hirs, C.H.W. and Timasheff, S.N., eds), Vol.XXVB, pp.464-468
- 221 Ellman, G.L.(1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77
- 222 Gray, W.R. (1972) in Methods in Enzymology 25B, pp.121-138 b) 田村基蔵 中區輝躬(1967) 蛋白質、核酸、酵素 12, 729-736
- 223 Weakley, B.S.(1972) Beginner's Handbook in Biological Electron Microscopy, Churchill Livingstone
- 224 Weber, K. and Osborn, M.(1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
- 225 Choules, G.L. and Zimm, B.H. (1965) Anal. Biochem. 13, 336-344
- 226 Udenfriend, M., DeBernardo, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. and Weigele, M.(1972) Science 178,871-872
- 227 Padan, E. and Rottenberg, H.(1973)Eur. J. Biochem. 40, 431-437. (ABB 161('74)581-591)
- 228 Rossi, C.S., Bielawski, J. and Lehninger, A.L.(1966) J. Biol. Chem. 241, 1919
- 229 Witkop, B.(1961) in Advances in Protein Chemistry 16, 221-321
- 230 Smith, L. and Packer, L.(1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 270-276
- 231 Singer, T.P., Kearney, E.B. and Kenney, W.C.(1973) in Advances in Enzymology 37, 189-272
- 232 Tamaura, Y., Todokoro, K., Ikebe, M., Makino, H., Yamazaki, S., Hirose, S. and Inada, Y.(1975) FEBS Lett. in press
- 233 Weigele, M., de Bernardo, S., Leimgruber, W., Cleeland, R. and Grunberg, E.(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 899-906

- 234 Klotz, I.M. and Fiess, H.A. (1960) Biochim. Biophys. Acta 38, 57-63
- 235 Carraway, K.L., Lam, A., Kobylka, D. and Huggins, J.(1972) Anal. Biochem. 45, 325-330
- 236 Fonyo, A.(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1069-1073.
 b) Klingenberg, M.(1974) Eur. J. Biochem. 42, 135-150
- 237 Bruni, A., Pitotti, A., Contessa, A.R. and Paratini, P. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 268-274
- 238 Roelofsen, B. and van Deenen, L.L.M. (1973) Eur. J. Biochem. 40, 245-257
- 239 Stekhoven, F.S. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47,7-14
- 240 Capaldi, R.A. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 163, 99-105
- 241 Mernick, R.L., Tinberg, H.M., Magquire, J. and Packer, L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 311, 230-241
- 242 Capaldi, R.A., Hunter, D.R. and Komai, H.(1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 655-671
- 243 Ferguson, S.J., John, P., Lloyd, W.J., Radda, G.K. and Whatley, F.R. (1974) Biochim. Biophys. Acta. 357, 457-461
- 244 de Duve, C.(1971) J. Cell Biol. 50, 20 D-55D; (50, 5D-19D)
- 245 Glass, R.S., Williams, E.B., Jr. and Wilson, G.S. (L974) Biochemistry 13, 2800-2805
- 246 Carter, J.R., Jr.(1973) Biochemistry 12, 171: "Role of SH groups in erythrocyte membrane structure"
- 247 Mahadevan, S. and Sauer, F.(1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 185-193

MPOUND	APPLICATION	REFERENCE
erolein CHs=CHCHO	Mitochondria	Hirose <u>et al</u> .(170)
	Mitochondria (uncouler binding site)	(126)
-Acetamido, 4'-isothiocyan		CH=CH-O-HCS (171)
tilbene-2,2'-disulphonic a	cid L	(172)
-Bromosuccinimide	Microsome Am	(173)(190)
2-Chloromercumbenzoic acid	(ion transport) (electron transport)	(174)(190b) (175)(176)
زر	(energy transfer) Erythrocytes Brythrocytes	(175)(176) (246) (177)
Difluorodinitrobenzene	Mitochondria	Hirose et al. (178)
Dansyl Chloride	Erythrocyte	(179)(180)
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenz		Hirose et al.(181)
5,5'-pitniobia(z-nivious	Mitochondria S-W-NO1	(28)(182-185)
1-(5-Dimethylaminonaphthal	ene- Cholinergic receptor	(186)
1-sulfonylamido) propane-3 trimethyl ammonium iodide	=	PHY TA
Deformamido azido antimyci		(187)
		em II) N=N-(0)-60,H (188)
Diazonium-benzenesulfonic	Mitochondria, Liver (ell	(189)(190)
N, N-Dicyclohexylcarbodiimi	Bacterial membrane	(191)
O-Mate-III O	(ATPase)	(192)(193)
Diazonium-1,2,4-triazole	Chloroplasts (photosystem I)	
N-Ethylmaleimide	Chloroplasts (coupling factor 1)	(194)
W-Parity Illiano Illiano	Mitochondria (ion transport)	(173c)(28)(190c)
N-(Ethyl 2-diazomalonyl)- 3':5'-cyclic monophospha	adenosine	(195)
	annu QCC (u.toccols)	(196)(197)
Fluorescein mercuric acet	ate 6 Mitochondria	Hirose et al (津集中
Fluorescamine	Mitochondria Co	(198)
*Formylmethionyl sulphone methyl phosphate	otto Erythrocytes	(199)
Glutaraldehyde Hco(CHz), CHO	Erythrocytes(sugar)	(200)
*Galactose oxidase	Mitochondria	(28)
Methylene blue	(AdN carrier) Mitochondria	(183)(190b)
Mersaryl *Pyridoxal phosphate	Virus(membrane prote	in) (201)
*Peroxidase + H ₂ 0 ₂ + 135 _I	Erythrocytes	(202)
Permanganate ion MaQ	Chloroplast	(203) (204)
2-Phenylindolone	Mitochondria	(205)
Selenium	Mitochondria	
Tetranitromethane	Mitochondria	(185)
dh-C-No	Insulin receptor	(206) (172)
	Microsome	(172)
Tellurite TeO;	Mitochondria	(207)
Trinitrobenzenesulfonic		(220) N-COCH (183)
N-Acetyl-4-sulfonylmalei	mide Mitochondria (Pi carrier) 75))
N-(4-azido-2-nitropheny)		*** (211) (211) (211)
aminosthylsulfonic acid	Mitochondria(electi Chloroplast Brythrocyte	,
2,4-Dinitro-5-(bromoace		site) (214)(215)
Water-soluble carbodiim	ide; Chloroplast mino- (electron transfer	chain) (CH,))CH-CH-N=(-N-CH, (216
propyl)-carbodiimide)	Erythrocyte	(162)(217
*Neuraminidase	- Mitochondria	(218
*Phospholipases	Erythrocyte	53(173)290 (162
7-Chloro-4-nitrobenzo-2		-01, Anal.Bioghem.) (243