

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

≡ミトコンドリア膜の高エネルギー状態に関する研究



D 2022. 広瀬茂久

指導教官 稲田祐二助教授

	〈目次〉	
I	序論	7
I-1	細胞呼吸研究の歴史	1
I-2	ミトコンドリア研究の歴史	6
I-3	酸化的リン酸化	2
I-4	ミトコンドリアの構造と機能	3
I-5	酸化的リン酸化の機序	5
I-6	本論文の主旨	7
II	陽イオン性色素によるミトコンドリア膜内電荷の探索および除共役剤、カルボニルシアニドメタクロロフェニルヒドラゾン(ccdp)の作用機作の解析	
II-1	序	8
II-2	実験方法	
II-2-1	試料	12
II-2-2	吸収スペクトルおよびケイ光スペクトル変化の測定法	13
II-2-3	pH 変化の測定法	13
II-2-4	溶存酸素濃度測定法	14
II-2-5	ミトコンドリアに結合したローダミン 6G の定量法	14
II-3	結果	
II-3-1	ローダミン 6G とミトコンドリアの相互作用	
	§1. 陰イオン性物質によるローダミン 6G の吸収スペクトル変化	15
	§2. ミトコンドリアの高エネルギー化に伴うローダミン 6G のスペクトル変化	15
	§3. ローダミン 6G の取り込みに伴う H ⁺ 放出	17
II-3-2	ピナツアノールとミトコンドリアの相互作用	17
		13
		14
		14

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	20
§2	酸素パルス法によるCCCPの作用機作の解析	23
II-4	考察	
II-4-1	ローダミン6Gを用いて得た知見	27
II-4-2	酸素パルス法による実験結果に関する考察	30
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	
III-1	序	34
III-2	実験方法	
III-2-1	アクロレインによる修飾	36
III-2-2	ダンツルクロライドによる修飾	37
III-3	結果	
III-3-1	アクロレインによる修飾	
§1	アクロレインとアミノ酸および蛋白質との反応	39
§2	アクロレインとミトコンドリアとの反応	40
§3	電子伝達系に与えるアクロレインの影響	42
§4	エネルギー依存性のCa ²⁺ イオンの取り込みに及ぼすアクロレインの影響	43
III-3-2	ダンツルクロライドによるミトコンドリアの修飾	
§1	ダンツル化に伴うミトコンドリアの形態変化	44
§2	ミトコンドリアに反応したダンツルクロライドの定量	46
III-4	考察	
III-4-1	アクロレインによる修飾	47
III-4-2	ミトコンドリアのダンツル化	48
IV	要旨	51
V	引用文献	54

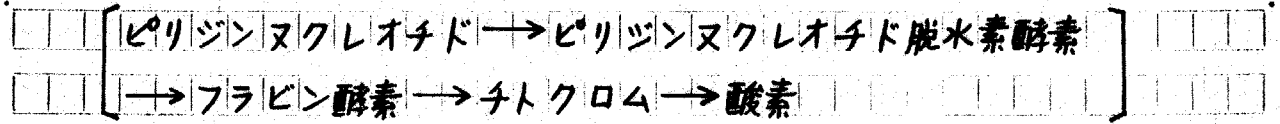
Abbreviations (本論文で用いる略号)

AdN	Adenine nucleotide
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
ANS	1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid
As	Arsenate
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adenosine triphosphatase
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
BTB	Bromothymol blue
CCCP	Carbonyl cyanide <u>m</u> -chlorophenylhydrazone
CD	Circular dichroism
C-side	Cytochrome <u>c</u> side of the mitochondrial inner membrane
Cyt	Cytochrome
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimide
DDA ⁺	N,N-dibenzyl-N,N-dimethylammonium cation
DNP	2,4-Dinitrophenol
DNS-Cl	Dansyl chloride; 1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Glycoletherdiamine-N,N,N,N'-tetraacetic acid
F ₁	Mitochondrial ATPase
FCCP	Carbonyl cyanide <u>p</u> -trifluoromethoxyphenylhydrazone
FeS	Non-heme iron protein
Flu-PE	Fluorescamine-treated phosphatidylethanolamine
FMN	Flavin mononucleotide
β -HB	β -Hydroxybutyrate
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
IM	Inner membrane
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
Pi	Inorganic orthophosphate
Prot	Protein
Q	Coenzyme Q
QM-BSA	Quinacrine mustard-bovine serum albumin complex
R [⊕]	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 <u>p</u> -phenylenediamine
TNBS	Trinitrobenzene sulfonate
TNM	Tetranitromethane
TNP ⁻	Trinitrophenol
TNS ⁻	2-p-Toluidinonaphthalene-6-sulfonate
TPAC	Tetraphenylarsonium chloride
TPB ⁻	Tetraphenylboron
TPMP ⁺	Triphenyl methyl phosphonium cation
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
val	Valinomycin (cf. Val; Valine)
X~Y	High energy state of the mitochondrial membrane (~)
ϕ H	Protonated form of uncoupler(ϕ^-)
Δ H ⁺	Proton gradient
ΔA_{526}	Absorbance change at 526 nanometer (nm)
F ₅₅₇	Relative fluorescence intensity at 557 nm

I. 序論

I-1. 細胞呼吸研究の歴史(1-3)

細胞が生命の維持に必要なエネルギーなどのような機構を獲得しているかは古くから人類が抱きつづけてきた疑問であり、現在も生化学における最も大きな課題の一つとされている。呼吸研究の歴史は1780年に Lavoisier が生物に酸素が不可欠であることを示した時より始まるが、近代的な展開が始まったのは19世紀末である。その後、Keilin (1925) によるチトクロムの発見、Euler, Schlenk (1942), Warburg によるピリジンヌクレオチドの単離構造決定およびその作用機作の解明、Warburg と Teorell によるフラビンヌクレオチドとフラビン酵素の発見などによって次のような呼吸鎖の基本骨格が明



らかにされるとともに、細胞呼吸の研究は Szent-Györgyi (1935) による四炭素カルボン酸が呼吸作用促進効果を有することの発見を経て Krebs (1937) によるクエン酸サイクルの提唱へと発展した。

このように1930年代は生体酸化の研究が開花した時期であり、たが呼吸に伴って遊離されるエネルギーがどのような形でどのように利用されるかについてはあまり注意が払われなかった。ATP 自体は Lohman によって1937年に発見されていたが細胞内エネルギー変換における ATP の重要性が認識されたのは後のことで、1937年になってはじめて Kalcker が「呼吸によって糖質と炭酸ガスまでに完全に酸化し、この時放出されるエネルギーを ATP とする形で貯える」という今日の考え方に近い酸化的リン酸化の概念を提出し Belitzer と Tzibokova (1937) がその理論的根拠を与えた。しかしこの時点では呼吸酵素系が細胞のどの場所にどのような形で存在するかについてはほとんど注意が払われなかった。

I-2. ミトコンドリア研究の歴史(1-4)

以上のような細胞呼吸の生理化学的な研究とは独立に、ミトコンドリア

	03

は Kölliker らによつて 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) らによつてミトコンドリアに特異的な染色法が見出され、組織化学的な研究が進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 らは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いることを示した。

ミトコンドリアを遠心法によつて分離しようと試みた Bensley (1937) の先駆者的研究とそれに続く 1940 年代のロックフェラー研究所で Claude, Porter, Hogeboom, Schneider, de Duve, Palade (1948) らによつてなされた仕事により、健全なミトコンドリアの分離法が確立し細胞科学の目ざましい発展の基礎が築かれた [5, 244]。この分離法を用いて、当時、脂肪酸酸化の研究を行つていた Lehninger と Kennedy (1949) により、細胞呼吸におけるミトコンドリアの役割の全貌が明らかにされた。すな

わち、ミトコンドリアはクエン酸サイクル、脂肪酸酸化、酸化のリン酸化に關するすべての酵素を含み、細胞の“エネルギー生産工場”であることが明らかになった。

Ⅰ-3. 酸化のリン酸化*

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、アミノ酸は最終的にクエン酸サイクルに入つ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の的であり、生体はエネルギー

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コンドリア内で起るもので、呼吸鎖 (電子伝

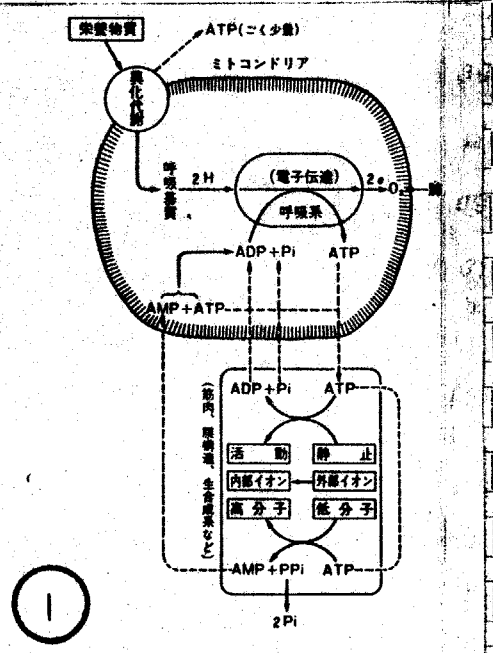


Fig.1. Energy cycle of animal cells. ATP, the common carrier of energy, is formed in the mitochondria.

* oxidative phosphorylation

達系ともいう)での電子伝達に共役した ATP の合成反応を酸化リン酸化と呼んでゐる。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礎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(クロマトグラフィ、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膜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れ、すでに多くの総説[6+15, 25]や成書[1, 3, 16-24]をみるに至つてゐるが、ミトコンドリアの最も重要な機能である酸化リン酸化の機構は未だには、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ゐる。

Ⅰ-4. ミトコンドリアの構造と機能

ミトコンドリアの構造と機能について本論文に関連する基本的な点について略述すると; ミトコンドリアは1μ程度の径を持つ細胞内顆粒(図2)で内膜と外膜より成つてゐる。内膜は主としてリン脂質と多種類のタンパク質から成る集合体で、ここに、酸化還元反応によつてエネルギーを遊離する電子伝達系と、このエネルギーを利用して ATP を合成するエネルギー転移系とがうめ込まれてゐる(図3)。電子伝達系およびエネルギー転移系に関する酵



Fig.2. Electron micrograph indicating the principal structural features of the mitochondria.

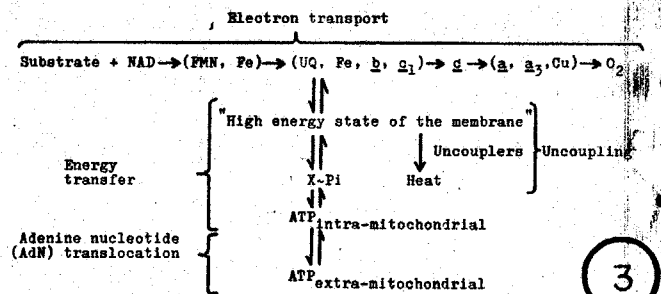


Fig.3. Chemical reactions of energy conservation in mitochondria.

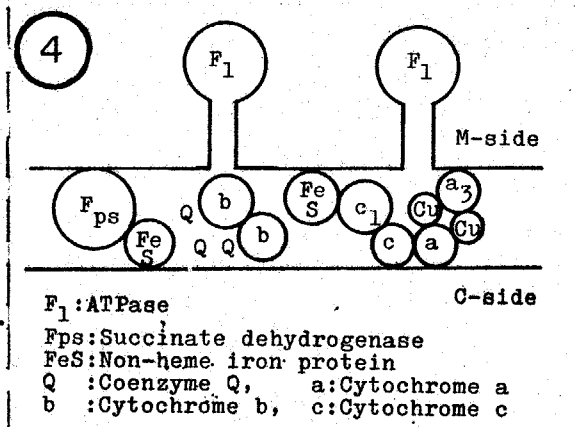


Fig.4. Anisotropic binary arrangement of protein subunits in mitochondrial cristae.

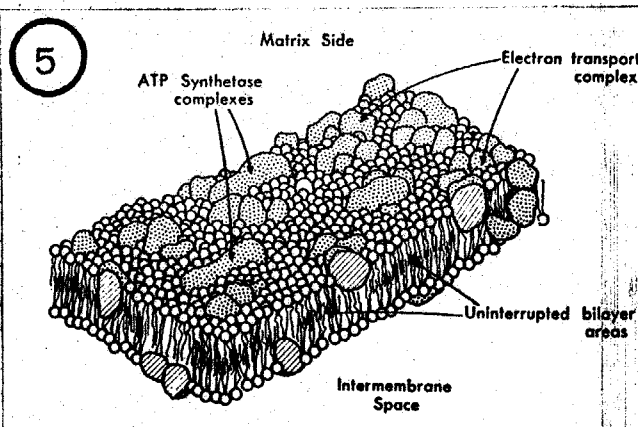


Fig.5. Tentative topography of the inner mitochondrial membrane.

素の多くは内膜における存在部位が明らかにされてゐる(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a, a₃は両側にまたがってまたF₁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], Fessenden-Raden [26]およびRacker [14], Packer [27, 図5]らによつて内膜の模式図が提出されてゐる。また電子伝達系とエネルギー転移

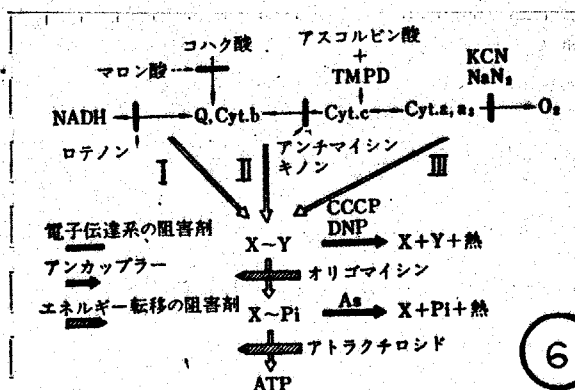


図6. ミトコンドリアの電子伝達系およびエネルギー転移系と阻害剤の阻害部位

Fig.6. The sites of action of inhibitors

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との関連でその作用機作が注目されてゐる。

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⁺をはじめNAD, ADP, ATP

略号	M-side; matrix side
	C-side; cytochrome c side

などに対しても不透過性である。従って必要な代謝物の移動のためには特異的な膜透過機構が必要であり、実際に、単離はされていなが、ADP/ATP キャリアー (担体, [28, 29]) やリン酸キャリアー [28, 30] などの存在が知られてくる [31, 32]。人工的にキャリアーと類似した作用を有する物質をミトコンドリア膜に導入することによってイオン透過を促進させることもできる。抗生物質の一種であるバリノマイシン* がこの典型的な例である [33]。バリノマイシンはアミノ酸とヒドロキッ酸とが交互に 12 分子結合した環状ペプチド (cyclic depsipeptide) であり、脂溶性でかつ K^+ と錯体を作るためミトコンドリア膜の疎水性部分に溶け込み K^+ の透過を促進する [34, 35]。内膜を自由に透過できるものとしては NH_4^+ , CH_3COO^- などが知られてくる。

ミトコンドリアの主な生化学的機能

能は酸化のリン酸化による ADP と P_i からの ATP の産生ならびに NADPH を介

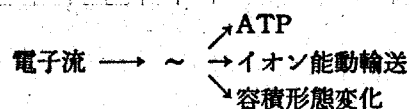


Fig.7. The multiple mode of utilization of the energized state (~).

する細胞内の合成反応に必要な還元力の供給であるが、これらと密接に関連して

イオン輸送や収縮、膨潤などの形態変化の仕事もすることができる (図7)。図にも示したように電子伝達の結果遊離したエネルギーはまず $X \sim Y$ (単に \sim とも記す) として保存され、一部はイオン透過などの仕事に使われるが、残りの大部分は最終的に ATP に変換され保存されることになる。現在のところ、 $X \sim Y$ の実体が不明であるため電子伝達の結果、エネルギー転移系の初期段階にエネルギーの蓄積した状態を高エネルギー状態と呼び、便宜上 $X \sim Y$ と表示してある。

I-5. 酸化のリン酸化の機序

酸化のリン酸化のエネルギー伝達の機序を考える際に $X \sim Y$ の実体として高エネルギー化合物を仮定する化学説、 H^+ の電気化学ポテンシャルを仮定する化学浸透圧説、高次構造の変化を仮定するコンホメーション説、電荷のかたよりを仮定するエレクトロカノケミカル説が作業仮説として提出され、現

* Valinomycin	D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hov-D-Val-L-Lac	Lac; Lactic acid
(MW. 1111)		Hov; α -Hydroxy-isovaleric acid
	D-Hov-L-Val-L-Lac-D-Val-D-Hov-L-Val	Val; Valine

在精力的な検討が加えられてゐる。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]) によつ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とするが, 最大の弱点は多くの試みにもかかわらず, 仮説の中心となす高エネルギー中間体の存在が実証されなことをとである。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システムによる 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ゐる。

(2) コンホメーション説 (conformational coupling hypothesis)

筋肉は ATP の水解によつて遊離したエネルギーを機械的な仕事に変換してゐる。これと類似した, しかし方向は全く逆の過程によつて原理的には, ATP の生成が可能である点に着目して, Boyer [42], Green [43], Hackenbrock [44] らによつて本仮説が提出された。本説によれば, 電子伝達によつて先ずミトコンドリアの内膜成分のコンホメーションがひずみのかかた準安定な状態へと変化し, この準安定な高エネルギー状態がもとにもどる過程に共役して ATP が生成すると考える。最近 Green と Ji [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つて, 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, 復極するとき ATP 合成等の吸エルゴン反応を可能にするというエレクトロメカノケミカル説 (electromechanochemical model) を発表してゐる [46]。また, Boyer ら [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ゐる。

* supermolecule

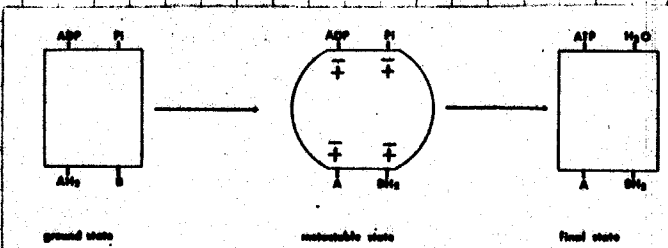


Fig.8.

(3) 化学浸透圧説 (chemiosmotic coupling hypothesis)

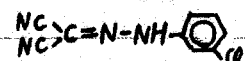
生体膜の能動輸送に関する研究によって明らかにされていった概念をもとに, Mitchell (1961, [48]) によって体系化され提起された本仮説は, 電子伝達とリン酸化反応とは膜を隔てた pH 勾配により共役するとするもので, 閉じた小胞膜の存在が必要である。すなわち, ミトコンドリア膜は H^+ に対して不透過性であるため, 電子伝達の結果 H^+ 勾配* (正確には電気化学ポテンシャル差, $\Delta\mu_{H^+}$ のことで, H^+ motive force ともいう) が生じ, これが F_1 を駆動して直接に ATP を合成すると考えるわけである。本仮説の実験的検討は数多く, 再構成実験 [49, 50, 51, 52] をはじめ多くの報告が本説を支持しているが, Slater [6], Chance [53], Pressman [54] らにより激しく反論されている。本仮説の成立のために必要なリン酸化部位 III における missing factor (H^+ と e^- とを分離する要素, p 31, 図 30 中の Z) が多くの研究者の努力にもかかわらず見出し出されていなく, 一つの大きな難点である。さらに本説の基礎となっており閉じた小胞膜は必ずしも必要ではないとする報告 [55, 56, 57] もある。

エー 6. 本論文の主旨

以上述べたように酸化リン酸化の現象そのものはすでに 1930 年代に見出し出されているにもかかわらず, そのメカニズムや高エネルギー状態の実体には, まだに解明されなく多くの問題が残されている。本研究は, 陽イオン性色素により, ミトコンドリア膜内電荷の状態を調べ, それとの関連でアンチカップラーである CCCP** の作用機作の解析を試みる一方, 化学修飾法を用いて高エネルギー状態の実体を探索したものである。

* ATP 合成のエネルギーを 15.6 Kcal/mole, 1 モルの ATP 合成に 2 当量の H^+ の移動が必要であると仮定すると, ATP 形成のためには少なくともミトコンドリア膜内外で 5.7 ユニットの pH 差が必要となる [58]。今, 外液が pH 7.8 であるとするミトコンドリア内の pH は 2.1 でなければならぬ。この矛盾を解決するために, 他のイオンの寄与をも考慮した膜電位の考え方 (約 240 mV に相当) が導入された。しかし実測値 [59, 60] はいずれも小さく, pH 差にしても, 人工的に H^+ 勾配を大きくした条件下でも, せいぜい 1.5 [61] である。

** CCCP; carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone



II. 陽イオン性色素によるミトコンドリア膜内電荷の探索および
除共役剤, カルボニルシアニド×タクロロフェニルヒドラジン(CCCP),
の作用機作の解析

II-1. 序

染料やケイ光性色素などの探索試薬を生体膜系へ導入しその機能状態を調べようとする試みはいくつかなされてき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 Azzi, Chance ら [62] が ANS を用い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とらえることができたと報告してからである。ちょうどその頃, 酸化リン酸化の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いた。ミトコンドリア全体としての容積変化はないが, 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メーションを変化することより, Hackenbrock [44], Green [15] らは, このコンホメーション変化こそが, ATP のエネルギーに直接変換される高エネルギー状態の実体であろうと考えた。しかしながら, その後の研究で内膜の大きなコンホメーション変化は極微量の ADP の存在に特異的なもので, エネルギー変換との一義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チドキャリアー [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術ではこれ以上の微細構造, 例えば生体試料中の個々の分子およびその微少なコンホメーション変化を観察することは不可能なため, 探索試薬をミトコンドリア膜に導入する方法が再び注目されるようになり, 上述の色素法以外に, NMR [66] やスピラベル法 [67, 68] が盛んに用いられている。コンホメーション説はなれても, この種の研究はミトコンドリアの構造と機能理解する上で欠くことのできな多くの知見をもたらすであろう。

ANS を用いて細かい解析が進められる一方で, 表 I に示すような多くの染料やケイ光性色素が探索試薬として開発され, 大まか次のような情報が累積された [69, 70, 71]。

略号	CCCP; carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazine
	ANS; 1-aminonaphthalene-8-sulfonic acid
	NMR; nuclear magnetic resonance (spectroscopy)

(i) 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ミトコンドリア膜に結合し、その吸収スペクトルあるいはゲイ光スペクトルを変化し、阻害剤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。同様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ソニウム⁺イオン、テトラブチルアンモニウム⁺イオンなどを用いても確かめられた。

(ii) 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した亜ミトコンドリア粒子** は脂溶性アニオンを取り込む。

これら (i), (ii) の結果の解釈としてス通りの説明が可能である。1つは① Azziら [69] の主張のように高エネルギー化に伴ってミトコンドリア内膜の外側 (図9の c-side) がマイナスに、マトリックス側 (M-side) がプラスになるように電荷の分離が起き、このようにして生じた膜内電荷に反応して、

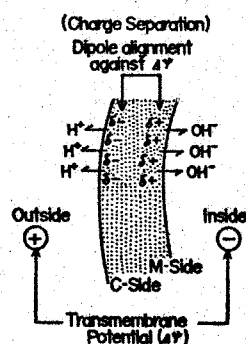


Fig. 9.

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

表裏が逆になっており、マトリックス側 (M-side,

プラス) が外液と接しているため脂溶性アニオン

を取り込むことになる。Azzoneら [80], Lee

[104], Kraayenhof [75] らは、ミトコンドリ

ア膜を負の固定電荷を持った膜系 (fixed negative-

→ 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、ミトコ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

場に基づきもので、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トコ

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] の

* 中性付近に pK_a 値を有しプロトン化の結果プラスに荷電しているもの、例えばアクリジンオレンジ、アテブリンなどは永久電荷を有するカチオンとは異なり、挙動をとることがあるから注意を要する。

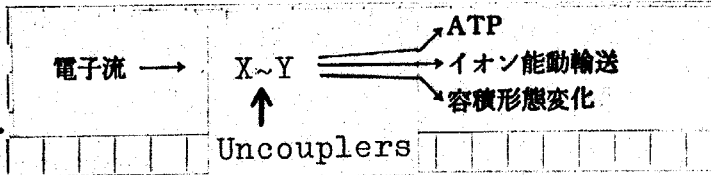
** 一般にミトコンドリアと亜ミトコンドリア粒子とは膜の表裏が逆になっていると考えられている (いしがら [105] を参照)。

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、これをもとに複雑な系における結果を解釈しようとする試みが乏しく、①、②のいずれが正しいかは、はっきりしなかったが、著者らはモデル実験を基礎にして、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あとしばらく時間がかかるものと思われる。

本章では、著者らの開発した色素で、上述のようなミトコンドリアの高エネルギー状態探索の分野で有用な役割を果たしたローダミン6G、ピナツアノー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い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いて触れておきたい。

リン酸化反応とは無関係に電子伝達反応のみが進行しATP合成が行われなくなることを除共役といい、低濃度で除共役作用を有する薬物をアンカップラーと呼んでいる。2, 4-ジニトロフェノール(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, FCCPがよく使用されるが、これらのアンカップラーをミトコンドリアに添加すると(ii)数倍の呼吸促進(p42, 図37参照)とATP生成の完全な抑制および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、(iii)アンカップラーの作用部位は、図10

Fig.10. The site of action of uncouplers.

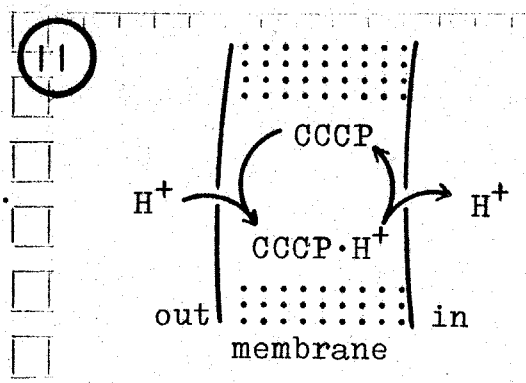
に示すようにX~Yであると考え

略号, FCCP; 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(ii)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-b]。

(I) 化学説およびコンホメーション説の立場に立つ仮説[36, 107-112]: アンカップラが酸・塩基触媒として直接高エネルギー中間体を加水分解なしに、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役まできなくすると考えるもので、Slater [36], Lardy & Wellman [108] によ、提唱された。

(II) Mitchellらの仮説[48, 113]: アンカップラをH⁺伝導体*であるとする説である。化学浸透圧説ではX~Yの実体として膜を界するH⁺勾配を仮定するが、アンカップラはこのH⁺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分子は膜内のリン脂質より成る疎水性部分にとけ込み、膜の外側でH⁺を結合し、内側でそれを解離することによって、図11のように、H⁺勾配を消失させると考える。

Fig. 11. The mechanism of proton conduction by CCCP across the membrane.

(III) van Dam および Kraaenhofの仮説[114, 115]: この説もアンカップラのサイクリックな移動を特徴としているが、化学説の立場に立つものであり複雑な仮定をして11る。**(I), (II)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を添加するとH⁺の透過性が増大することが見出し出されて以来[116, 122], (II)のH⁺伝導説が有力となり、その妥当性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]やリボゾーム膜を用いた実験[120, 121]でも、アンカップラがH⁺伝導体として

* proton conductor
 ** 解離型(φ⁻)のアンカップラ分子が基質等のア=オンキャリアによってエネルギー依存、つまりX~Yを消費して膜内に運ばれ、内側で再びプロトン化し(φH)、今度は自由拡散によりもどり、外側で解離しφ⁻となる。この過程のくり返しによってX~Yが消費される結果アンカップラすると考える。

作用することが確かめられ、Mitchellによって提出された作用機作が強く支持されるようになってゐる。しかしながら、これら H^+ 伝導作用と除共役作用とを直接結びつけることには異論もあり、否定的な結果も報告されてゐる [123, 131]⁸²。中でも、Hanstein [126] はアンカップラー結合部位を決定することによつて、特定部位にアンカップラー分子が結合することが除共役に必要なのであつて、 H^+ 透過の増大は必ずしも必要ではな⁸³としてゐる。またリゾレチン^{*}でミトコンドリア膜を可溶化した実験より、Hunterら [56, 128, 129] は膜の必要性を否定し、Mitchell 説の基盤に疑問を投げかけてゐる。さらに単離精製した酵素標品 (F₁ [132-134], ミオシン ATPase [135]) に対してもアンカップラーが作用する事実などが報告されるにつれ、(I) の直接作用説が再び注目されはじめてゐる。

以上が現在までのアンカップラー研究の概略である。CCCP の作用機作の解析を試みた著者らの仕事については本章 II-3-2 ~ 3 節で触れ、CCCP の作用機作を考える上で興味ある事実を示すとともに、 H^+ 勾配の消失は付随的な現象にすぎないであろうことを示す。

II-2. 実験方法

II-2-1. 試料

ミトコンドリアは新鮮なラット肝臓より常法 [136] に従つて分離したものをを用ひ、その濃度は $mg\ protein/ml$ で表示した。これに必要なミトコンドリアのタンパク量は、ビュウレット法 [137] によつて定量した。分離したミトコンドリアは $30 \sim 40\ mg\ protein/ml$ となるように $0.25\ M\ sucrose\ (pH\ 7.0)$ 液に懸濁し、氷水中に保存した (この条件下では、4 時間後でも極わずかの失活しかみられな⁸⁴)。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ゐるホモツ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、本研究ではルーズなガラス製ホモツナイザーによつて、手動で大まかに膜細胞をホモツナイズするにとどめた。脂溶性カチオンであるローダミン 6G、ピナツア

* lysolecithin (lysophosphatidyl choline)

ノール, テトラフェニルアルソニウム, トリブチルアンモニウムは東京化成工業の製品を用い, バリノマイシンは Calbiochem 社の製品を使用した。

II-2-2. 吸収スペクトルおよびケイ光スペクトル変化の測定法

吸収スペクトルは自記分光光度計 Cary 14M を用いて測定した。ケイ光スペクトルの測定には日立自記分光光度計 MPF-2A を使用し, 励起光として 347 nm の光を用いた。1 cm セルに 3.5 ml のミトコンドリア懸濁液 (1 μM ロテノンを含む) を入れ, これに 50 μl あるいは 25 μl の基質, 色素および阻害剤を目的に応じて添加して下記濃度となるようにし, その時の吸収スペクトルおよびケイ光スペクトル変化を測定した。

反応系: 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 5 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.4 mg protein / ml, pH 7.2 ----- (A)液

基質および阻害剤: 2 mM Succinate, 2 mM Glutamate, 2 mM Ascorbate, 0.3 mM TMPD, 1 μM Rotenone, 0.2 μM Antimycin A, 1 mM NaN₃, 1 μM CCCP, 10 μM Rhodamine 6G, 2 mM p-Hydroxybutyrate, 6 μM Pinacyanol,

II-2-3. pH 変化の測定法

pH 変化の測定は複合電極 (東亜電液, GC-135C) をセットした高感度 pH X-ター (横河, KPH-51B) に記録計 (日立, QPD-53) を接続して行った。反応系 (5 ml) はクーリニット (大洋, CL-20) で一定温度に保った。反応液 4.5 ml にミトコンドリア懸濁液 0.5 ml を加えた後, 25 μl の 0.2 mM ロテノンと 50 μl のコハク酸を添加し 0.02 N KOH あるいは HCl で一定の pH に合わせた後, 攪拌下に, 脂溶性カチオンや阻害剤等を添加し, それに伴う pH 変化を測定した。変化量は外部標準として 0.01 N HCl を 25 μl (50 μM H⁺) あるいは 50 μl (100 μM H⁺) 添加し算出した。小さな pH 変化を測定しやすくするためには反応液の pH 緩衝能は弱くしてある。

反応液: 80 mM KCl, 2 mM HEPES, pH 7.0 ----- (B)液

0.25 M Sucrose, 15 mM KCl, 2 mM HEPES, pH 7.0 ----- ©液

基質および阻害剤: 0.1% Triton X-100, 0.05 μ M Valinomycin, 100 μ M $CaCl_2$,

400 μ M EGTA, 約 3 mg ミトコンドリア蛋白/ml.

II-2-4. 溶存酸素濃度測定法および酸素パルス法

ミトコンドリアの呼吸に伴う溶存酸素量の減少は上記(II-2-3)と同じ条件下で、クラーク型酸素電極を用い密閉系で測定した。酸素パルス法による実験は常法に従い、次のように行った: 密閉系にミトコンドリア懸濁液と十分な量の呼吸基質を入れて放置し、ミトコンドリアの呼吸によって溶存酸素が消費され無酸素状態になるのを待つ。これに一定量の酸素を供給し、瞬間的に電子伝達系を作動させると同時に、この酸素消費(電子伝達系の作動)に伴うミトコンドリアの諸機能の発現、例えば本研究で検討するエネルギー依存性の H^+ 輸送などの過程を調べる。酸素の供給は、酸素を飽和したエチルアルコールないしは水溶液の一定量を添加して行うことができる。この時必要なエチルアルコール中の溶存酸素量は、一定量(50 μ l)のエチルアルコールを酸素電極をセットした水溶液(5 ml)中に添加し決定した。

II-2-5. ミトコンドリアに結合したローダミン 6G* の定量法
一定量のローダミン 6G を共存させたミトコンドリア懸濁液(5 ml, A液, 0.4 mg protein/ml) を遠心(10000 $\times g$, 10 分)しミトコンドリアと上清に分離した後、上清に残っているローダミン量を分光学的に決定し、この値をはじめに添加したローダミン量から差し引き、間接的にミトコンドリアに結合した量を算出した。

* rhodamine 6G; *o*-[6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl]-benzoic acid, ethyl ester

II-3. 結果

II-3-1. ローダミン6Gとミトコンドリアの相互作用

§1. 陰イオン性物質によるローダミン6G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6G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, これにテトラフェニルボロン, ペンタクロロフェノール, ラウリル硫酸ナトリウム (SDS[⊖]) などの脂溶性アニオンを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ペクトルに変化する。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])。

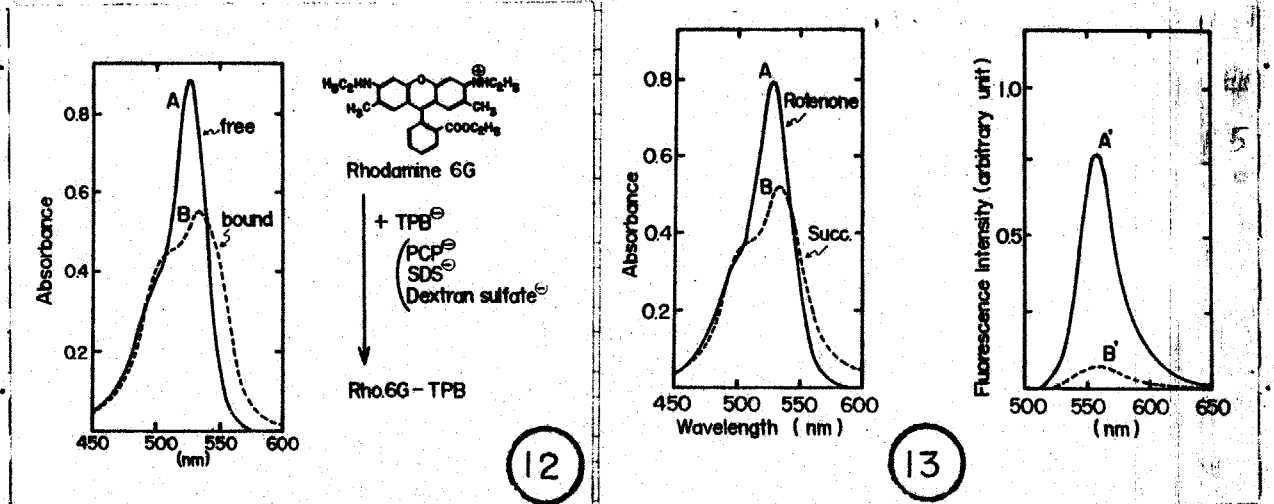


Fig. 12. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the absorption and fluorescence spectra of rhodamine 6G. Curves B and A: absorption spectra of 10 μM rhodamine 6G with and without 250 μM SDS, respectively.

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

§2. ミトコンドリアの高エネルギー化に伴うローダミン6G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6Gの吸収スペクトルとケイ光スペクトルである。ロテノンと共存させ基質を加えない場合は曲線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, これ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, それに伴いローダミン6G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

田番号, SDS; sodium dodecyl sulfate, (laurylsulfonate)

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ことより、ローダミン 6G カチオンはミトコンドリア膜内電荷と相互作用しているものと推定される。

基質と阻害の組合わせによりミトコンドリアの高エネルギー状態の生成消滅をくり返すことができる (p4, 図6 参照)。この時のローダミン 6G の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル変化をそれぞれ 526, 557 nm の波長で調べた結果を図 14 に示した。グルタミン酸, コハク酸, およびアスコル

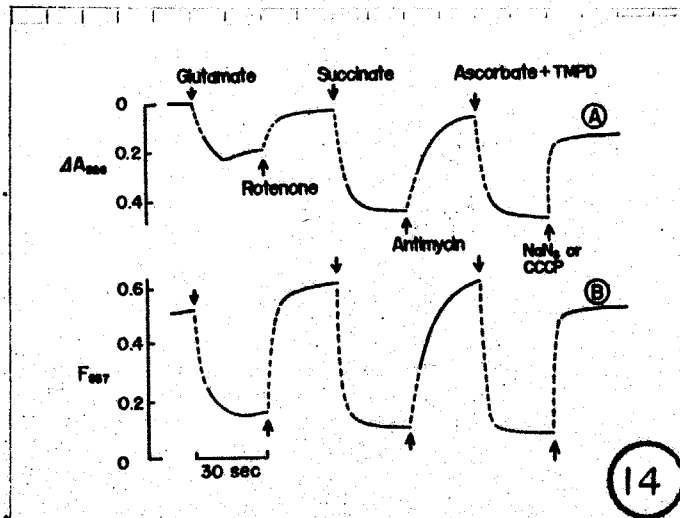


Fig.14. Changes in absorbance and fluorescence intensity of rhodamine 6G and mitochondria with time on addition of various substrates and inhibitors. Curve A: absorbance change, ΔA_{526} . Curve B: change in fluorescence intensity, F_{557} .

ビン酸+TMPDと11、た基質の添加により吸収スペクトル (ΔA_{526}) 蛍光スペクトル (F_{557}) と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ノン, アンチマイシン, アツドおよびアンカップラーである CCCP によって、もとの遊離型にもどることがわかる。

またロテノンを添加したサンプル (脱エネルギー状態) と、これにコハク酸を添加したサンプル (高エネルギー状態) とを遠心することにより、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 6G がより多量に結合していることが確かめられた (図 15)。

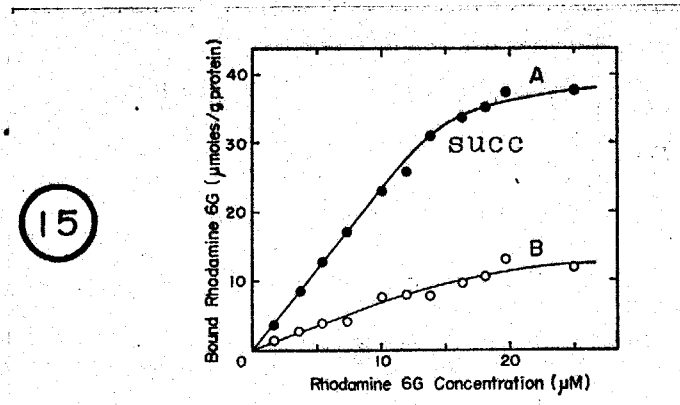


Fig.15. Relationship between the amount of rhodamine 6G bound to mitochondria and the amount of dye added to the mitochondrial suspension. Curve A, with 2 mM succinate. Curve B, without succinate. The reaction mixture consisted of mitochondrial suspension (0.4 mg protein/ml) and 1 μM rotenone.

略号, TMPD; tetramethyl p-phenylenediamine

§3. ローダミン6Gの取り込みに伴うH⁺放出

前節でミトコンドリアの高エネルギー化に伴う膜内電荷に対応して、ローダミン6Gカチオンがミトコンドリア膜に結合し、阻害剤添加による脱エ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6Gの取り込みおよび放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

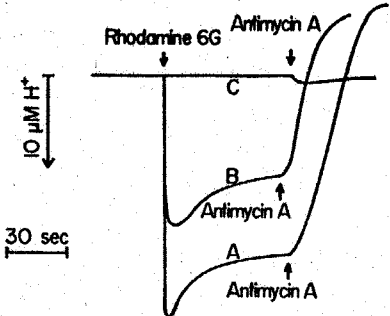


Fig.16. H⁺ changes of the mitochondrial suspension on adding rhodamine 6G and 0.5 μM antimycin A. The reaction system contained 80mM KCl, 2mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES, pH 7.2), 2mM succinate, 10 μM rotenone, and mitochondria (2.8mg protein/ml) in the presence and absence of rhodamine 6G. Curves A and B, with 75 and 36 μM rhodamine 6G, respectively.

16

と交換にH⁺が外液中へ放出されることが知られて^{*}いる。曲線A、Bに示すように、ローダミン6Gの添加とともに外液中のpHは急激に低下し、この時放出されるH⁺量は添加したローダミン量に比例することが

わかった。アンチマイシンを加えて高エネルギー状態を消失させると、逆の過程(ローダミン6Gの遊離)が起き、一旦放出されたH⁺が再び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6Gカチオンの取り込みと放出をH⁺の出入りで追跡できることであり、従って次節、II-3-3で述べるようにH⁺勾配との関連を詳しく検討することが可能である。

II-3-3. ピナシアノール^{*}とミトコンドリアの相互作用

陽イオン性色素の一種であるピナシアノールを用いても、ローダミン6G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(次頁の図17)および色素がミトコンドリアに取り込まれる際のH⁺放出(図18)が観察された[12]。簡単に図の説明をみると; 図17, 曲線④は

* pinacyanol (a carbocyanine dye); 1,1'-diethyl-2,2'-carbocyanine

* 透過性の陰イオン, 例えばリン酸, 酢酸イオンなどが存在しない場合。

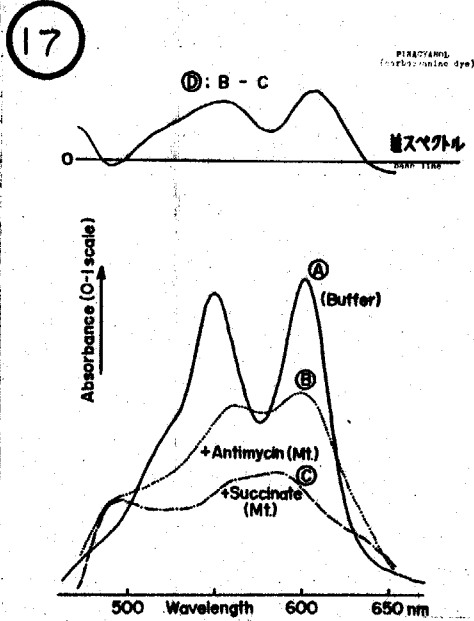


Fig.17. Absorption spectra of pinacyanol bound to mitochondria. Curve A; in aqueous solution, curve B; in mitochondrial suspension with antimycin, curve C; in energized-mitochondrial suspension.

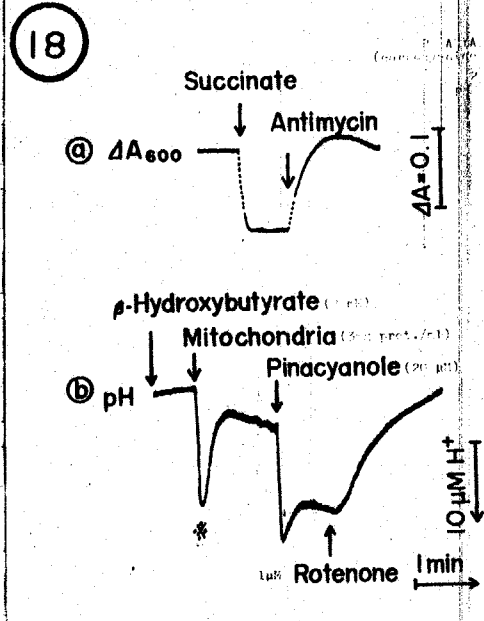


Fig.18a. Changes in absorbance with time on addition of succinate and antimycin A.

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

水溶液中におけるピナツアノールの吸収スペクトルである。これに高エネルギー状態のミトコンドリアを添加すると大部分の色素がミトコンドリアに結合する結果、③のようなスペクトルに変化する。続いてアンチマイシンを加えて、ミトコンドリアを脱エネルギー化すると、ピナツアノールの一部が結合部位よりはずれて②のようなスペクトルに変化する。曲線①は②と③の差スペクトルである。600 nm 付近に差スペクトルの極大値があるが、この波長でミトコンドリアの高エネルギー化および脱エネルギー化に伴うピナツアノールの吸収スペクトル変化を調べたのが図18、曲線②である。曲線②には pH X-ターの記録を示した。基質である β -ヒドロキソブチレートと共存させた反応系にミトコンドリアを添加すると、添加液(ミトコンドリア)の pH のずれやミトコンドリアの呼吸の開始にともなう一過性の pH 変化^{*}が起きた後、ほぼ一定の pH を示すようになる。この時点でピナツアノールを加えると急激な

* 図18、曲線②の*EP。この pH 変化にはミトコンドリアによる基質アニオン (β -ヒドロキソブチレート, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{COO}^-)$) の取り込みと交換に外液中へ放出される OH^- を寄与していると考えられる [13] OH^- がここにはあまり問題にしない。

H⁺放出が起き、続くロテノン添加による脱エネルギー化によりもとにもどることがわかった。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、ピナツアノ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ツアノールと、キモトリプシノーゲンに結合したピナツアノ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あり、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ゆく上で参考になる知見と思われる。

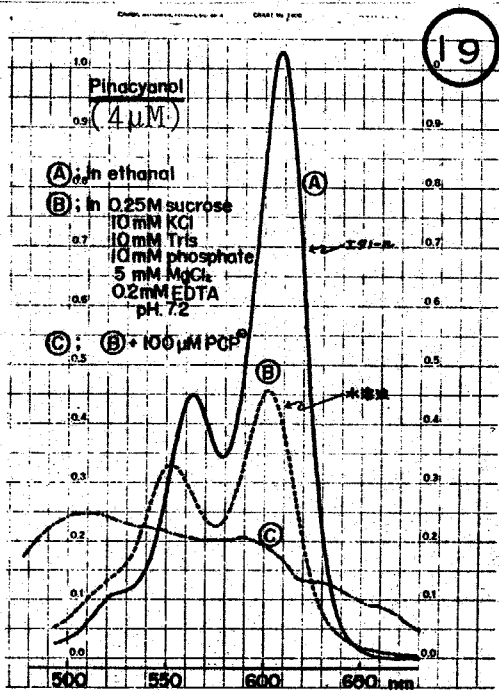


Fig.19. Absorption spectra of pinacyanol in various media.

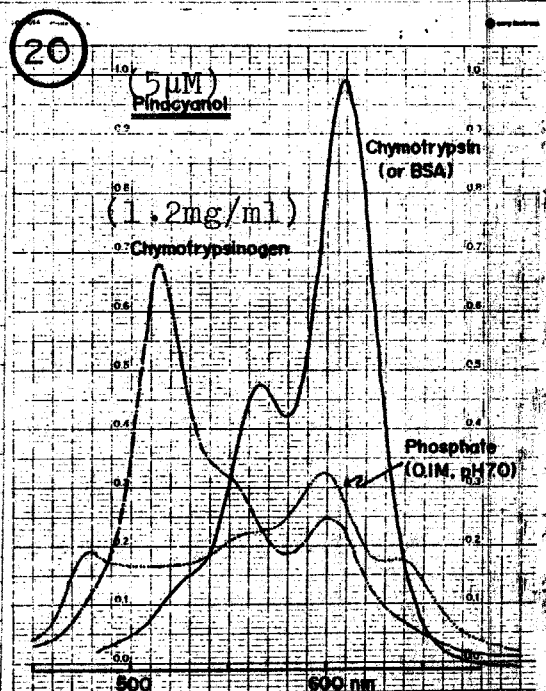


Fig.20. Absorption spectra of pinacyanol bound to proteins.

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一つであるCCCPを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 H^+ の流入がみられる。CCCPによって引き起こされるこの現象はミトコンドリア膜を界する H^+ 勾配の二われを反映しているものと考えられている。また、ミトコン

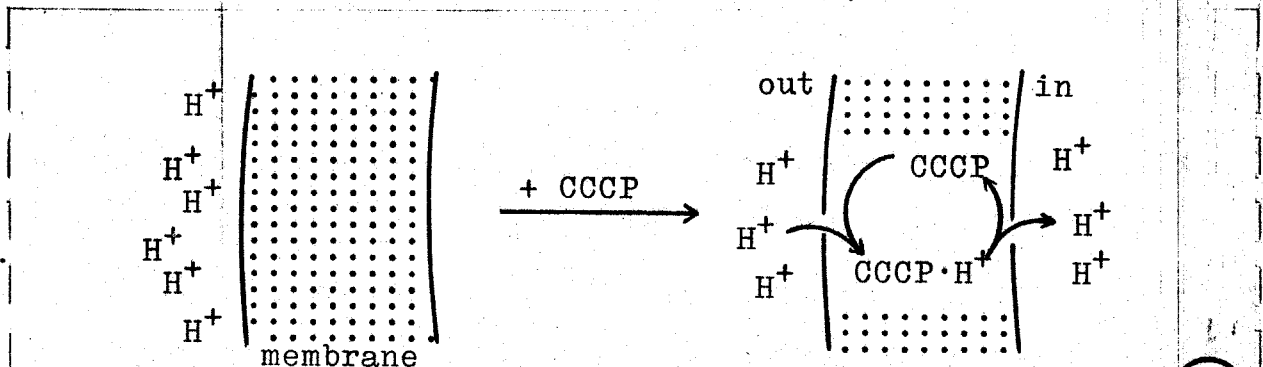


Fig. 21. The mode of action of CCCP as proton conductor.

21

ドリア懸濁液にHClを加えた場合、ミトコンドリア内部が低pHとなるまでにかなりの時間を要するが、CCCPの存在下では、添加した H^+ がすみやか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この H^+ 伝導作用によって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? — H^+ 伝導作用は副作用にしかすぎないのではなから? — 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、脂溶性カチオンが遊離してくるのと、 H^+ 勾配が二われるとどちらがより早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であり、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6G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)。続いてローダミン6Gを取り込んだミトコンドリアにCCCPを添加すると、図

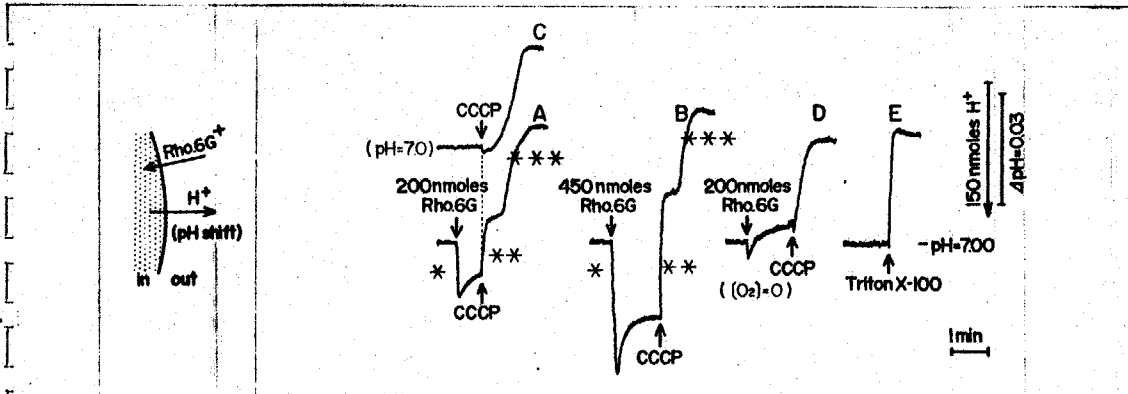


Fig. 22. The H⁺ change of a mitochondrial suspension (3.5 mg protein/ml) with 2mM succinate after the addition of rhodamine 6G and subsequent addition of CCCP. The reaction mixture (5 ml) was maintained at pH 7.0 and 17°C.

22

22. 曲線 A, B に示すように二段階からなる pH 変化が観察された。曲線 A, B の比較よりわかるように、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二倍になってゐること、およびローダミン添加の際の pH 変化量 (*印) とよく一致してゐることより、第一段階目の pH 変化 (**印) は結合してゐたローダミンが 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 6G の吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルが第一段階目の変化と並行して結合型から遊離型に変化してゐることからも確かめられた。次に、二段階目の変化が何を反映してゐるかを検討した。曲線 C は、CCCP 添加によってミトコンドリアの H⁺ 勾配がこわれる過程を示してゐる。CCCP の添加後その効果が現われるまでには 30 秒近くの時間を要してゐること、および曲線 C の pH 変化量と曲線 A に示した二段階目の pH 変化量がよく一致してゐることより上述した二段階目の pH 変化 (**印) が H⁺ 勾配のこわれに相当するものと考えられる。界面活性剤 (0.1% Triton X-100) でミトコンドリア膜をこわした場合は、曲線 E に示すように、すみやかに H⁺ 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 6G の取り込みはみられな

以上のことより、CCCP 添加によってローダミン 6G が完全に遊離してしまつてゐる状態、いわゆる脱エネルギー状態でも H⁺ 勾配がしばらくの間、保持され得ることが明らかになった。従つて高エネルギー状態の消失を H⁺ 勾

配の二つで説明することは困難であり、次の実験結果もこのことを裏づけて
 いる。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

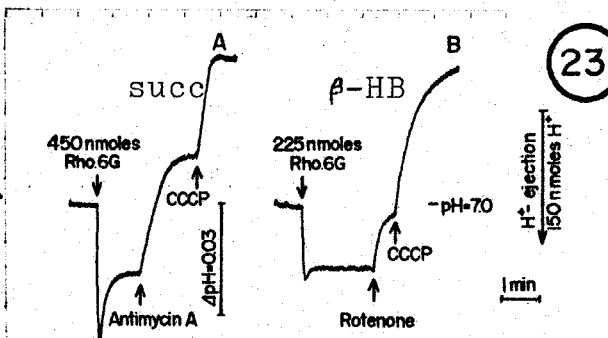
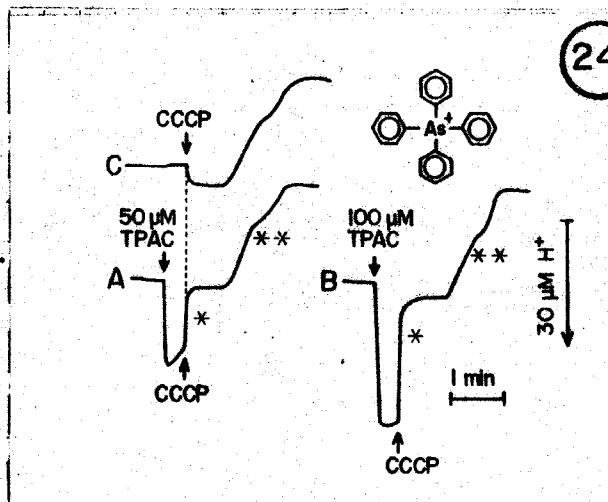


Fig.23. The H⁺ change of a mitochondrial suspension (3.5 mg protein/ml) with substrate after the addition of rhodamine 6G and subsequent addition of inhibitors. The reaction mixture (5 ml) was maintained at pH 7.0 and 17°C.

23

のミトコンドリアにローダミン6Gを
 取り込ませた後にアンチマイツンを添
 加し、脱エネルギー化させると、結合
 していたローダミン6Gが遊離してく
 るが、この状態ではまだ H⁺ 勾配が保
 持されており、続く CCCP 添加によ
 りてはじめて H⁺ 勾配が消失する。曲線
 Bも同様の実験で、基質としてβ-ヒ

ドロキツブチレートを用い、電子伝達



24

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

の阻害剤としてロテノンを加えた場合
 の結果である。このようにアンチマイ
 ツンやロテノン添加により、脱エネル
 ギー状態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、こ
 れら CCCP-感受性の H⁺ 勾配がかわ
 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
 ソニウム (TPA⁺)、テトラブチルアン
 モニウム (TBA⁺)、を用いた実験でも
 前頁の図22と同様のことを確かめることができた。TPA⁺を用いた場合の結果
 を図24に示した。曲線A、Bに*印と**印で示したように、CCCP添加に
 よって、TPA⁺の遊離とH⁺勾配の二つに相当する2段階のpH変化が起
 ることが確かめられた。

略号, β-HB; β-hydroxybutyrate
 TPAC; tetraphenylarsonium chloride

図22~24はいずれも pHメーターのみの記録であったが、これに酸素電極を組合わせた記録を図25に示す。脂溶性カチオンを取り込んだミトコンドリアに CCCP を作用させた時にみられる2段階の pH 変化のどこで呼吸が

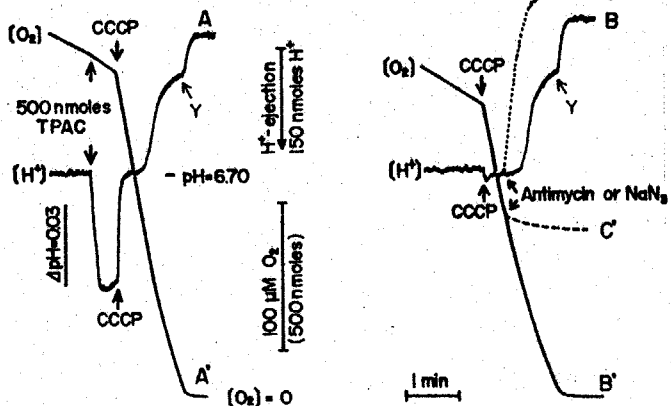


Fig.25. The H⁺ change and O₂ consumption of a mitochondrial suspension (4.0 mg protein/ml) with 2 mM succinate after the addition of 500 nmol TPAC (curves A and A', respectively) and the subsequent addition of 1 μM CCCP at the points indicated by arrows. Curves B and B': in the absence of TPAC. Curves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

25

解放*されるかを調べたものである。曲線A'に示すように、TPACの添加により、わずかの呼吸促進がみられるが、これに CCCP を加えると直ちにアンカッパル(除共役)することがわかる。曲線B, B'およびC, C'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、本章でおつかっている CCCP-感受性の H⁺ 勾配消失過程が電子伝達系の機能状態と密接に関連していることを示している。これについては次節、II-3-3; §2で触れる。

§2. 酸素パルス法による CCCP の作用機作の解析

ミトコンドリアを基質の存在下にしばらく放置すると溶液中の酸素が消費され無酸素状態になる。これに少量の酸素を補給すると、ミトコンドリア懸濁液中に H⁺ が急激に放出されることが Mitchell と Moyle [139] によって報告されて以来、上述の酸素パルス法は有用な実験法の1つとなっている。本節では、酸素パルス法によって CCCP の作用機作の解析を試みた結果について述べる。

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 H⁺ 勾配がかわれることは前に示した(p21, 図

* p42, 図37参照。

22)が、ちょうどこの時、無酸素状態になっている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

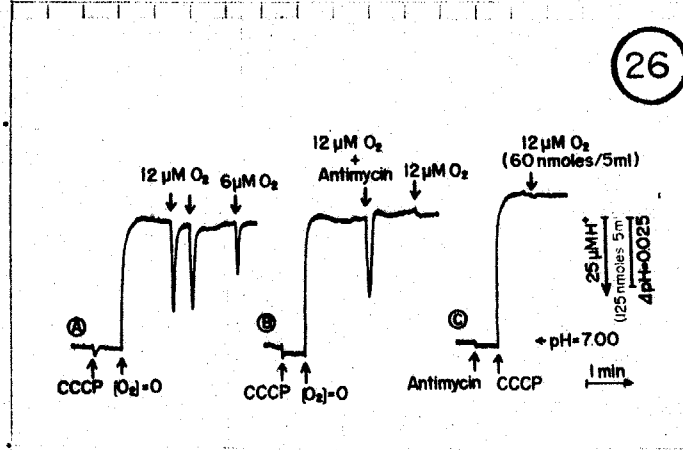


Fig.26. The H⁺-change of a mitochondrial suspension (3.5mg prot./ml) containing 0.25M sucrose, 15mM KCl, 2mM HEPES, 1μM rotenone and 2mM succinate after the addition of CCCP and subsequent addition of oxygen. 25°C, pH 7.0.

かどうかを調べたのが左図26である。曲線Aに示すように添加する酸素量に応じて H⁺ が放出されることがわかった。酸素とアンチマイシンAを同時に添加した場合の結果を曲線Bに示したが、この場合にも H⁺ 放出がみられることは、アンチマイシ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おり、酸

素消費とそれに伴う H⁺ 放出反応とは極めて速い反応であることがわかる。アンチマイシンによって電子伝達が阻害された後では、当然予想されるように、酸素パルスによる H⁺ 放出はみられなくなる (曲線B)。曲線Cはアンチ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 H⁺ 勾配がこわれ、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。

(i) 少なくともコハク酸を基質とした場合には、無酸素状態になるか、あるい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⁺ 勾配がこわれる。

(ii) CCCP の存在下でも酸素パルスにより H⁺ 放出が起る。これらの結果は、化学浸透圧説の立場に立つ従来の説明、すなわち CCCP は H⁺ 伝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加すると外液の pH が上昇することは Calafati 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、呼吸活性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、CCCP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。

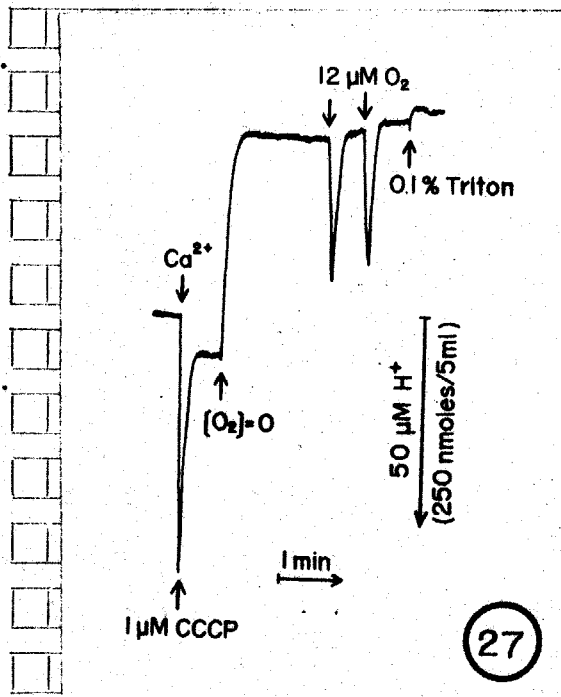


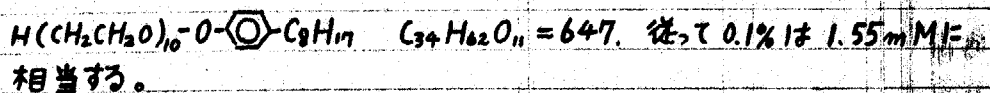
Fig.27. The H⁺-change of a mitochondrial suspension during the Ca²⁺-translocation and the pulsed oxygenation. Additions: 100μM CaCl₂, 1μM CCCP. Other conditions are the same as in Fig.26.

Ca²⁺の取り込みに伴うH⁺の放出を測定することによって、ミトコンドリアのCa²⁺取り込み能を調べることができる。このことを利用してCa²⁺イオンの輸送と上述した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Ca²⁺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一旦取り込まれていたCa²⁺が遊離し、外液のpHがほぼ元のレベルに回復するが、

H⁺勾配のこわれは少し遅く、無酸素状態になってはじめて起こることがある。CCCPによってミトコンドリアが除共役していることは、Ca²⁺イオンの取り込みが阻害されていることより明らか

ある。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Triton X-100で膜をこわしても、何らpH変化はみられない。Ca²⁺イオンの代りにK⁺イオンを用いて、上述の図27と同様のことを確かめたのが図28である(次頁)。

* Triton X-100 ; p-Isooctylphenoxy polyethoxy ethanol n=10



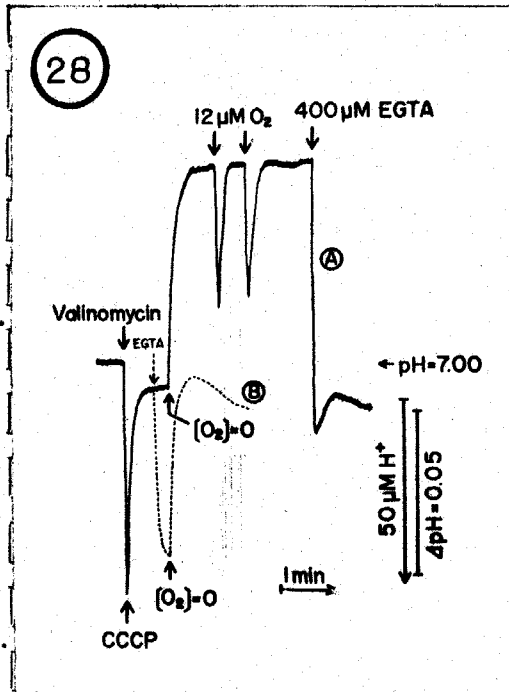


Fig. 28. The H^+ -change of mitochondrial suspension after the addition of valinomycin, CCCP and O_2 . Other conditions are the same as in Fig. 26. Addition: $0.05 \mu M$ valinomycin.

無傷のミトコンドリア膜は K^+ に対して不透過性であるため、 K^+ の透過を特異的に促進するバリノマイシンを外部より添加する必要がある。 K^+ はあらかじめミトコンドリア懸濁液中に加えてある。 K^+ の取り込みに伴う H^+ の放出反応をpHメーターで追跡することによって、 K^+ の輸送を調べた結果が曲線④(図28)であり、曲線⑤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 K^+

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^+ 勾配が二かわることがわかる。

現在までの研究では、④陽イオン輸送に伴う H^+ のミトコンドリア内への出入りと、⑤呼吸鎖に依存した H^+ 輸送とは、現象的

には別々のことであるが、CCCpの添加によって実験的に④、⑤を区別することは困難とされてきた(p32, 図31 参照)。図27, 28のように、 H^+ 伝導型に分類されているアンカップラーによって、④、⑤を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いた Ca^{2+} とEGTAの反応によるものと思われる($Ca^{2+} + H_2EGTA \rightarrow CaEGTA + 2H^+$)。この反応を利用して Ca^{2+} を定量することも可能である[141]。 Ca^{2+} を含まないミトコンドリアを調製することが困難であることから逆に Ca^{2+} イオンの役割について興味ある結果を報告している研究者もある[142]。

略号, EGTA; glycoetherdiamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid

II-4. 考察

II-4-1. ローダミン6G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6G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。

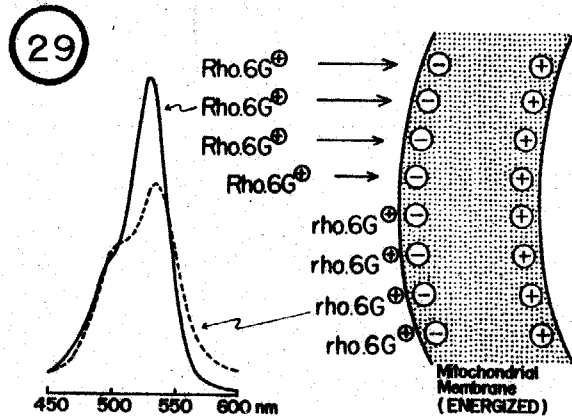


Fig.29. Hypothetical scheme of energy-dependent rhodamine 6G binding to the mitochondrial membrane.

ミトコンドリア膜内には \ominus で表示したのが、ローダミン6G分子と相互作用すると考えられる求核性残基であり、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ン6G分子どうしが相互作用* (プラス

スに荷電しているときは反発しあう) する結果、 π 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 H^+ 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** ことから支持される。

図15(p16)をもとにローダミン6Gの結合部位数を算出すると、ミトコンドリア蛋白1gあたり、20~40 μ 当量*** という値が得られる。

Azzomes[71] 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している。ミトコンドリア膜成分、例えばチトクロム類や F_1 の存在量は、それぞれ0.8, 0.3 μ mole/g蛋白以下であると推定されている[144, 145]からこれら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を考えれば量的に十分であろう。

* stacking of the dye

** 結果のところには示さなかったがヒナシアンールを用いた実験で確かめられた。

*** μ equivalents; μ moles と考えてもよい。

ローダミン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6 G の作用機作の解析を進め、ミトコンドリア膜に存在するアデニンヌクレオチド担体** を不活性化することを見出し出している。この種の阻害剤としては他に、アトラクチロッド [148] やボンクレキック酸 [149] *** が知られているが、Gear らの報告によれば、アトラクチロッ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にアデニンヌクレオチド輸送を阻害するのに対し、ローダミン6 G 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ヌクレオチド担体を不活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 G の少なくとも一部がアデニンヌクレオチド輸送系に結合することによって、アデニンヌクレオチド担体が不活性化されるが、ミトコンドリアの脱エネルギー化とともに結合していたローダミン6 G が遊離するため阻害も解除される。結果の解釈のところでも強調したように、ローダミン6 G の標的となっているものがエネルギー転移の際に極めて重要な役割を果たしていることより 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 ㉔ 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、膜内電荷の立場を主張したのは、主として以下の理由 (㉔ の i, ii) による。

㉔: 化学浸透圧説の立場にたつ解釈；本説に従え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 mV の膜電位が存在しており*、この膜電位に対応して脂溶性カチオンがミトコンドリア内へ電気泳動的に取り込まれると考える。このようにミトコンドリア内に濃縮された脂溶性カチオンが吸収スペクトルを有している場合には、Xタクロマツを起しして吸収スペクトルを変化し、ケイ光

* 高エネルギー状態の生成には何ら影響を与えないが X~Y から ATP が生成する過程を阻害する (図 6).
 ** adenine nucleotide (AdN) translocase; ADP-ATP carrier.
 *** atractyloside, bongkreikic acid.
 * 実測値に関しては p7 脚注参照。

を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 H^+ 放出は、脂溶性カチオンによって電子伝達系 (H^+ ポンプと考えるとよい)* が活性化された結果であると考えるわけである。

しかしながら、(B-i): 高エネルギー状態のミトコンドリアにアンチマイシンを添加して脱エネルギー化した場合、 Na^+ , K^+ , H^+ 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。膜電位の大きさや方向を決定するのは主として Na^+ , K^+ , H^+ 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ことは考えにくく、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 H^+ 勾配に代表される膜電位が高エネルギー状態そのものであるという考え方にも無理があるといえよう。(B-ii): 上述した (A) の解釈では脂溶性カチオンの取り込みの際にみられる H^+ 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 H^+ 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。特に図 22 (p21) に示したようにローダミン 6 G を取り込んだミトコンドリアに CCCP を添加した時にみられる 2 段階の pH 変化はそのことを強く支持している。イオン交換的な H^+ の出入りでなく、膜を隔てた H^+ 勾配の生成・消滅であるとすれば、CCCP によって 2 段階の pH 変化は観察されず、両者をいっ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^{2+} イオンの膜透過の研究を精力的に進めている Lehninger ら [151] もミトコンドリアに Ca^{2+} が取り込まれる際にイオン交換的過程が関与していることを報告している。概略を示すと、高エネルギー状態のミトコンドリアは Ca^{2+} を取り込みそれと交換に外液中へ H^+ を放出することはすでに述べた (p25, 図 27)。また電子伝達系が H^+ ポンプとして働いていると考える化学浸透圧説に従えば、コハク酸を基質とした場合には 1 対の電子あたり 4 個の H^+ が放

* H^+ 輸送性の呼吸鎖 (proton translocating respiratory chain) とも呼ばれる。

p31, 図 30 に化学浸透圧説に基づく H^+ 輸送の様式図を示した (ただし証明はなく仮説にすぎない)。

** Ca^{2+} 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考えは考えない。

出されることになる ($H^+/2e^- \approx 4$; p 31, 図 30 参照)。ところが, Ca^{2+} 取り込みの際にみられる H^+ 放出量とその時にコハク酸から酸素へと伝達された電子数とを比較すると 1 電子対 ($2e^-$) あたり 6 個をこえる H^+ が放出されていることがわかり, 長期間, 化学量論的に説明できない* 現象とされてきた。

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^+ ($H^+/2e^- > 20$) が放出されることを見出し, Ca^{2+} の取り込みの初期にみられる急激な H^+ 放出現象を電子伝達に伴う H^+ 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, Ca^{2+} 結合部位にプロトネーションした残基があり, これに Ca^{2+} が結合するとき Ca^{2+} と交換に H^+ が放出されると考えるべきであろうと述べている。 Ca^{2+} 結合部位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かにされなければならぬ問題であるが, 脂溶性カチオンの場合にもイオン交換的に H^+ が外液中へ放出されているものと類推される。

ミトコンドリアのエネルギー状態に依存したカチオン性色素の応答の著しい差異は, 膜内電荷近傍の大きなコンホメーション変化を反映しているものと推定される^{***}が, この意味で, Ⅲ章の仕事すなわち化学修飾法によってコンホ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。

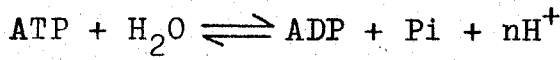
Ⅱ-4-2. 酸素パルス法による実験結果に関する考察

§ 2 (p 23) では, 酸化リン酸化の共役機構の裏面として重視されているアンカップラーの作用機構について, 酸素パルス法を用い, H^+ 勾配との関連で調べた。結果のところを示したようにミトコンドリア膜内外における H^+ イオンの消長には極めて興味深いものがある。 H^+ 輸送をともなうミトコンドリアの反応には次のようなものが考えられる。

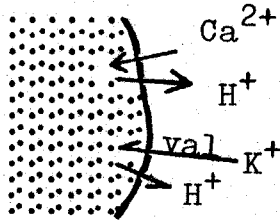
* superstoichiometry

** 葉緑体に関しては文献 [86 b] 参照

① ATP の合成および分解

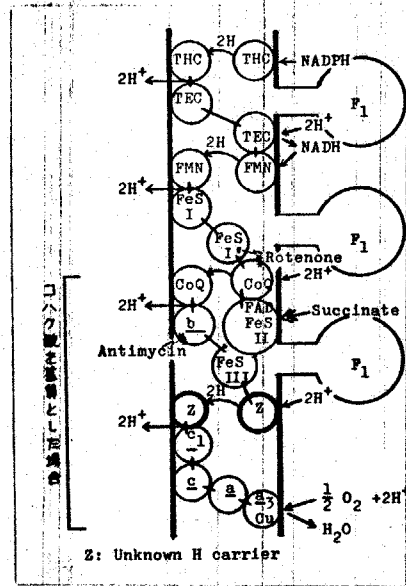


② 陽イオンの取り込みに伴う交換反応



③ H⁺輸送性の電子伝達反応 (右図30)

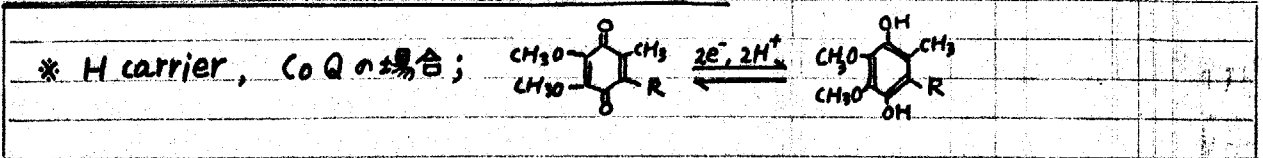
化学浸透圧説によれば非ハム鉄蛋白 (FeS I, II, III) やチトクロム (b, c, a, a₃) などの呼吸鎖成分がミトコンドリア内膜中で図31のように配列してH⁺を汲み取り、この電子伝達系の作用力によって、FMN, CoQ, ZなどのHキャリアーが膜の内側で還元され (Z + H⁺ + e⁻ → ZH) 外側で酸化される (ZH → Z + H⁺ + e⁻) 結果、プロトンが内から外へ輸送されることになり、呼吸鎖はプロトンポンプの働きをしていることになる。しかし、現在のところ推論の域を出ないといえる。



30

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

①, ②の過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わけではなく, 疑問視する研究者もある[152]。①, ②とは別に, 電子伝達反応に直接依存したH⁺放出現象が存在することは著者らの結果(図26~28)からも明らかであるが, これが果して③のような機構によるものかどうかに関しては確証がなく, コンホメーション変化に伴う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, 仮りに③の過程の存在を認めて議論を進めた場合, ③の結果生じるH⁺勾配を高エネルギー状態(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ある事実を得ることができた。前述の①~③の関係を、酸化的リン酸化のモデル(p6~p7参照)に基づいて模式的に示したの



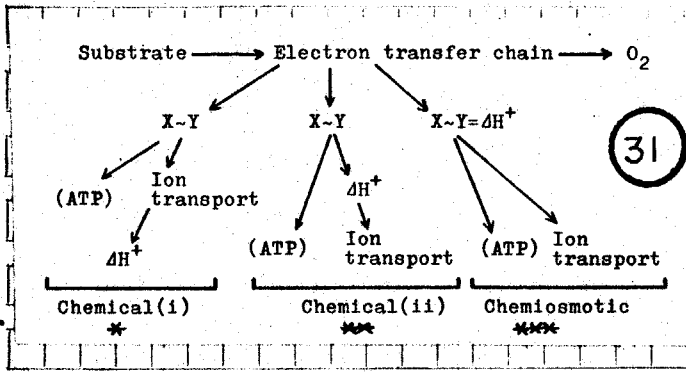


Fig.31. Essentials of the chemical and chemiosmotic theories.

が左図31である。化学浸透圧説によれば、図31の***印は示すように、電子伝達によってまずH⁺勾配が形成され、これによってATP合成やイオン透過などの仕事が行なわれると考え

るが、化学説(図31の*印および**印)の立場にたてば、

X~Y(高エネルギー中間体ないしはコンホメーション)によってATP合成やイオン透過、H⁺勾配の形成などが行なわれると考える。

本章で得た結果の重要性は、同一の実験で上述の②と③の過程を別々に観察することによって、③の電子伝達に依存したH⁺放出反応はミトコンドリアの高エネルギー状態と直接に結びついているわけではなく、むしろ電子伝達系の機能状態を反映しているに過ぎないことを示した点にある。②のイオン輸送に伴って生じるH⁺勾配に関しては、CCCPの添加と同時に消失すること(図27, 28)*より、従来どおり上図31に示した(i)のように位置づけられる。またCCCPの作用部位はX~Y(キΔH⁺)**であるから、CCCPのH⁺伝導作用によって除共役の機構を説明することは困難であり、CCCPがX~Yの加水分解を解媒している可能性や高エネルギーコンホメーションを解除している可能性をも検討する必要がある。分子レベルにおけるアンカップラーの作用機作の解明は今後に残された興味深い問題である。

界面活性剤***で膜を処理することによりH⁺勾配の生成・消滅を確かめることができる。このことを利用して得た結果(p21; 図22, 曲線Eおよびp25, 図27)をもとに、ここでは著者らが酸素パルス法によってとらえた呼吸依存性のH⁺輸送現象は上述した③の過程(すなわち、化学浸透圧説の概念に基づく図30)を反映しているものと仮定して議論を進

* p25, p26
 ** p10, 図10参照
 *** 一般に Triton X-100 (p25 脚注) が使用されるが低濃度で用いる時は valinomycin 様の作用が表われるため注意が必要である [153]。

めてきたが、確かな証拠があるわけではなく、③とは別の機構で起きている H^+ 放出反応をとらえている可能性もある——もしそうだとすれば新しい現象を見出したことになる。詳細は今後の研究に待たねばならないが、いずれにしても、本章の結果は、エネルギー変換機作の解明において一つの鍵とされている H^+ 放出反応の機構解明に大きな糸口を与えるものと期待される。

本章で扱った酸素パルス法による急激な H^+ 放出とは対照的であるが、基質添加によって促進された呼吸に伴い、除々に H^+ が外液中へ放出される現象が Smolwell [154] によって見出され、島瀬・小田 [155] によって認められているが、この場合に形成される H^+ 勾配も高エネルギー状態そのものとは直接関係がないとされている [155]。また、これらの報告中では、アンカップラーの作用機作については触れていないが、除共役機構に焦点をあてて彼らのデータ（例えば文献 154 の図 2）を再検討してみると DNP によって呼吸が促進されるとそれにつれ H^+ 放出反応も促進され、 H^+ 勾配がこわれるよりは、むしろ増大する方向の変化が読み取れる。アンカップラーが H^+ 勾配を消失させることなしに高エネルギー状態を消滅させ得ることを見出した著者の結果と考え合わせると興味深い。

アンカップラーの有する H^+ 伝導作用と除共役作用を直接結びつけることはできないことを示したが、このことを強く支持する結果が最近 Lardy ら [156] によって報告された； CCCP の作用が、電子伝達系の阻害剤であるロネノンやアンチマイツンなどによって大きく抑制されるという事実は、CCCP が H^+ 伝導体としてのみ作用しているとする考え方では説明できない。Kováč ら [157, 158] は CCCP が効かないミトコンドリアのミュータントを分離することに成功し、CCCP が H^+ 伝導体として働いているにもかかわらず除共役が起きないことを示した。また、Kaback ら [130] はバクテリア膜に対してではあるが、CCCP が膜成分に直接作用することを示している。

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

Ⅲ-1. 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われてきたが、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。特に、生命現象の広範な領域にわたっ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、多様な機能を営む各種の機能蛋白質からなる酵素系を含み、細胞内代謝におい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をくり返していることは言うまでもない。

このように、生命の基本単位である細胞の諸機能を統一的に理解するた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ある。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〕や Singer らの流動モザイク膜モデル^{**}〔160〕が提出されているが、ミトコンドリア膜をはじめとする個々の膜系、例えば、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には至っていない。

生体膜研究法の主なものとしては電子顕微鏡およびこれにフェリチン抗体法を組合わせた免疫電顕法などの形態学的方法、X線回折法、探索試薬を膜に導入して情報を得るスピラベル法やケイ光ラベル法、CD・ORD・NMR をも含めた分光学的方法、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を欠陥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（リポ

* asymmetrical lipid bilayer (アミ基を有するホスファチジル-イタリルアミンやセリンは内側に多く、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンは外側に多く分布する……赤血球膜)

** fluid mosaic model

略号 CD; circular dichroism (円偏光二色性)

* 文献は最近の総説〔164, 165〕参照。

ORD; optical rotatory dispersion (旋光分散)

ゾームなど〔120〕) を用い解析する方法も有用である。膜現象を分子レベルで理解するためには、今後ますます研究法の開発、改良が重要になるものと思われる。本章では化学修飾法のミトコンドリア膜への応用例を示す。

これまで化学修飾法は主として蛋白質の高次構造の研究に用いられ、蛋白質分子中のアミノ酸残基の状態識別や酵素の活性中心を構成するアミノ酸残基の決定などに有用な役割を果たしてきた。すでに特定のアミノ酸とのみ反応する特異性の高い修飾試薬が数多く開発されており〔166-169〕、最近では生体膜研究分野でもその有用性が注目されはじめている(表Ⅱ参照)。膜の化学修飾はよってもたらされる情報を大別すれば次のようになるであろう。

(1) 膜構成成分の存在場所の決定: 膜不透過性試薬によって膜の外側成分のみを標する〔171, 208-210, 198, 20〕。膜を透過できない酵素を利用してラベルする方法〔200, 202〕もある。これらは膜のどちら側にどの成分が存在するかを解明する方法であるが、膜面上での分布を調べるには二価性試薬による架橋法も考えられる〔177〕。

(2) 機能発現に関与する残基ないしは成分分子の推定: 修飾によって特定の機能が失活することに着目するもので、古くより阻害剤として用いられてきたSH試薬はこれに属する。DCCD〔189〕, TNM〔185, 206〕を用いた例もある。

(3) 機能発現機作(コホメーション変化等)の解明: 膜の機能状態——例えば、神経繊維の静止・興奮状態、ミトコンドリアの脱エネルギー・高エネルギー状態あるいはキャリアの負荷・空荷状態など——に対応した反応性の差異より、膜成分の状態を識別する。しかし膜が反応するばかりその機能状態も変化するため反応の初期段階に注目する必要がある。この例としては、アクロレイン〔170〕, ダンシルクロライド〔178〕をミトコンドリアに応用した研究、ダンシルクロライド〔179〕を赤血球膜に、ジアゾニウムトリアゾール〔193〕, NEM〔194〕, DTNB〔181〕, ^3H 〔20〕をクロロプラスト膜に応用した研究などがあげられる。

略号, DCCD; *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

TNM; tetranitromethane

NEM; *N*-ethylmaleimide

DTNB; 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

膜の状態を一定に保ったまま化学修飾することはむづかしく、従って、(3) のような情報を得ることは困難であるとされてきたこともあって (3) に属する報告は少ない。今後は (1), (2) とともに (3) の方向での研究の発展が望まれる。本章では (3) に示したような情報を得ることを目的として、アクロレインとダンツルクロライドを用いてミトコンドリアの高エネルギー状態を探索した結果について述べる。

Ⅲ-2. 実験方法

Ⅲ-2-1. アクロレインによる修飾

(i) 操作; 修飾しようとする試料液 (5ml) にアクロレイン* (市販のアクロレインを下記反応液②で種々の濃度にうすめたもの) 200 μ l を加え、この時、反応によって放出される H⁺ 量を pHメーターで測定することによって反応を追跡した。アクロレインは揮発性で反応性が高いため全操作をドラフト中で行う必要がある。

反応系: 80 mM KCl, 2 mM HEPES buffer (pH 7.0) ----- ②液

基質および阻害剤: 2 mM succinate, 2 mM β -Hydroxybutyrate, 1 μ M Rotenone,

0.5 μ M Antimycin A, 1 mM Azide (NaN₃), 1 μ M CCCP, 100 μ M CaCl₂, 2 μ g/ml

Oligomycin,

(ii) pKa 値の測定; 各種アミノ酸 (50 mM) 水溶液にアクロレイン (0.5 M) を反応させた後、自動滴定装置 (Metrohm E 336) を用いて、2 N NaOH で滴定しアクロレインとの反応によって変化したアミノ基の pKa 値を求めた。酸塩基滴定を目的とした実験であり、pH 緩衝液は使用できないため、HCl または NaOH で pH を合わせながら徐々にアクロレインを反応させる必要がある。

(iii) アミノ酸残基の定量法; 各種アミノ酸とアクロレインとの反応性を

* acrolein (CH₂=CHCHO)

調べるためにアミノ酸およびその誘導体 (50 mM, 反応液⑥) にアクロレインを反応させた後, 修飾されなかったアミノ酸残基をそれぞれ, アミノ基は 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定量し反応の有無を検討した。

III-2-2. ダンシルクロライド^{*}による修飾

反応にともなう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, ミ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る使用のために新しく調製した。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 nm の分子吸光係数を 3690 として分光学的に決定した。

(i) 反応に伴う形態変化の分光学的追跡; 540 nm の波長における吸光度変化 (ΔA_{540}) でミトコンドリアの形態変化を追跡することができる。一般に吸光度の減少が膨潤に対応する。

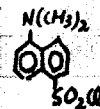
反応系: 0.25 M sucrose, 15 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 2 mM HEPES buffer,

pH 7.4, 20°C ----- ⑥液

基質および阻害剤濃度はアクロレインの場合と同じ (p 36)。

(ii) 修飾された膜のケイ光強度測定法; ミトコンドリア懸濁液 (1 mg 蛋白/ml; 20 ml) にダンシルクロライド (50 μ M) を添加し, 4 分後にウステイン (200 μ M) で反応を止めた後, 遠心 (8000 x g, 10 分) によってミトコンドリアを集め 1% SDS 溶液 (10 mM リン酸, pH 7.0; 5 ml) で可溶化し 1% SDS を含む 10 mM リン酸溶液 (pH 7.0) に対して透析し, ダンシ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も強い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, 自記分光

* dansyl chloride (1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride)



略号, TNBS; trinitrobenzene sulfonate, DTNB; 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

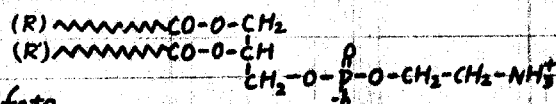
ケイ光光度計 (日立 MPF+2A) を用い、350nm の光で励起しケイ光強度 (相対値) を測定した。

(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、ミトコンドリア懸濁液 (20ml) に固定剤であるグルタルアルデヒドを1%となるように加え、直ちに遠心しミトコンドリアを集め、これをさらにグルタルアルデヒド (1%, 0.1M リン酸, pH7.0; 4°C, 30分) で固定した後、1% オスミウム酸で後固定 (4°C, 6時間) し、エチルアルコールで脱水処理後、エポキシ樹脂に包埋し切片を作製、続いて、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で電子染色し、電子顕微鏡 (日立, HS-9) で観察した [223]。

(iv) SDS ディスク電気泳動法

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 Weber と Osborn の方法 [224] に従って SDS ディスク電気泳動を行い、ケイ光スキヤナー (ヤマト科学, SFR-21) で各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 (プロモフェニールブルー) を用い、ゲルの架橋剤としては \times チレンビスアクリルアミドの代わりに 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) にダンシルクロライドを 150 μ M となるように添加し、2分後、遠心によってダンシル化されたミトコンドリアを集め、0.2% β -Xルカプトエタノールを含む 1% SDS 溶液 (4ml) で可溶化後、透析し (外液は 10mM リン酸, 1% SDS, 0.1% β -Xルカプトエタノール, pH7.0), 電気泳動用試料とした。ケイ光ラベルしたリン脂質 (Flu-PE) は、ホスファチジルエタノールアミン* (クロロホルム: \times タノール, 2:1 溶液) にフルオレスアミン [226] を反応させて調製し、これを 1% SDS 溶液 (10mM リン酸, pH7.0) に懸濁、放置後、上清の一部をとり、電気泳動しリン脂質のマーカーとした。ゲル濃度は 7.5%。

* phosphatidyl ethanolamine



略号, SDS; sodium dodecylsulfate

III-3 結果

III-3-1 アクロレインによる修飾

§1. アクロレインとアミノ酸および蛋白質との反応

一般にアミノ基が修飾されるとその pKa 値が大きく変化することが知られてゐる。従つて pKa 値の変化によつてアミノ基の反応の有無を調べることができる。pKa 値を求めるためのアルカリ滴定曲線を図 32 に示した。アクロレ

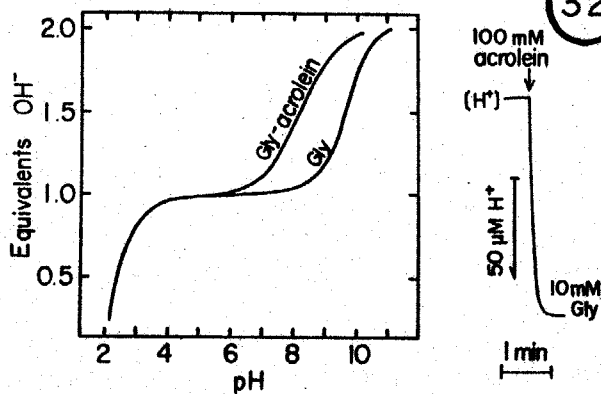


Fig.32a. Titration curve of 50 mM glycine, in the presence and the absence of 0.7 M acrolein, with 2N NaOH.

Fig.32b. H⁺-production by the reaction of acrolein with glycine. Medium: B.

インを反応させたグリッソではアミノ基の pKa 値が大きく酸性側へずれており実際にアクロレインによつてアミノ基が修飾されてゐることがわかる。pKa 値の酸性側への移行は H⁺ 放出を伴うので、例えば図 33-b に示すように、グリッソ溶液にアクロレインを添加す

ると H⁺ の放出が高感度 pH ヶターに記録される。次に、アクロレインの修飾試薬としての基本的性質 (反応性など) を検討した。

表 III 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 pKa 値の変化、H⁺ 放出量、アクロレインとの反応の有無を示した。アミノ基は

TABLE III

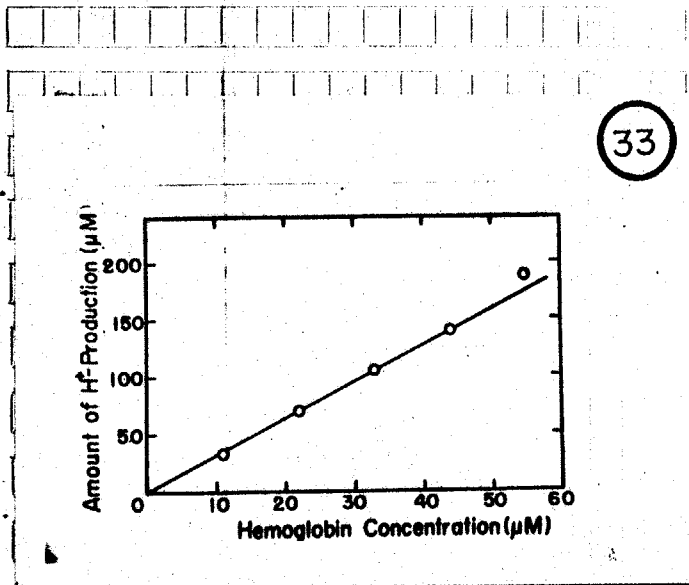
pKa SHIFTS, THE AMOUNTS OF H⁺ PRODUCTION AND THE REACTIVITIES OF AMINO ACIDS AND THEIR DERIVATIVES WITH ACROLEIN

Amino acid and its derivative	Functional group	pKa shift*	H ⁺ production** (μM)	Reactivity**
Glycine	α-Amino	9.7- 8.4	110	+
Serine	α-Amino	9.1- 8.0	216	+
Ethanolamine	Amine	9.5- 7.8	266	+
N-Acetyllysine	ε-Amino	10.1- 8.3	106	+
N-Acetylhistidine	Imidazole	6.8- 6.8	0	-
N-Acetyltyrosine	Phenol	10.1-10.1	0	-
N-Acetyltryptophan	Indole	-	0	-
N-Acetylarginine	GuanidinyI	-	0	-
N-Acetylcysteine	Sulphydryl	-	0	+

* Reaction mixture of 20 mM each amino acid and 0.5 M acrolein was titrated with 1.0 M NaOH.

** 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.

α -アミノ, ϵ -アミノ, アミンの欄に示したように, 反応の結果 pK_a 値の変化を起し H^+ を放出するがその他の残基では H^+ 放出はみられない。修飾に

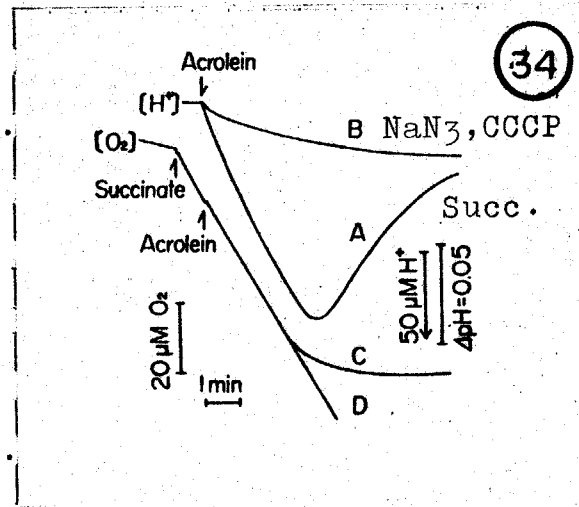


33

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 pK_a 値が低くなるものほど多量の H^+ が放出されることがわかる。SH基はアクロレインと反応はするが 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^+ 放出で容易に追跡することができる。以上はアミノ酸とアクロレインとの反応についてであるが, アクロレインが蛋白分子とも実際に反応し H^+ を放出することを確かめたのが図33である。 H^+ 放出量はヘモグロビン濃度に比例していることがわかる。

§2. アクロレインとミトコンドリアとの反応



34

Fig. 34.

Change in H^+ and O_2 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 O_2 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.

ミトコンドリアへの応用例を図34に示す。基質を共存させた高エネルギー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を探るうとしたものである。CCCP や NaN_3 などの阻害剤を共存させたミトコンドリアにアクロレインを添加しても, 曲線B

に示すようにわずかの H^+ 放出しかみられないが、これに比し、基質であるコハク酸を添加したミトコンドリアの場合には大きな pH 変化がみられた。この H^+ の放出量はミトコンドリア量に比例し(図 35)、 H^+ 放出速度は添加アクリロレイン量に比例する(図 36)。

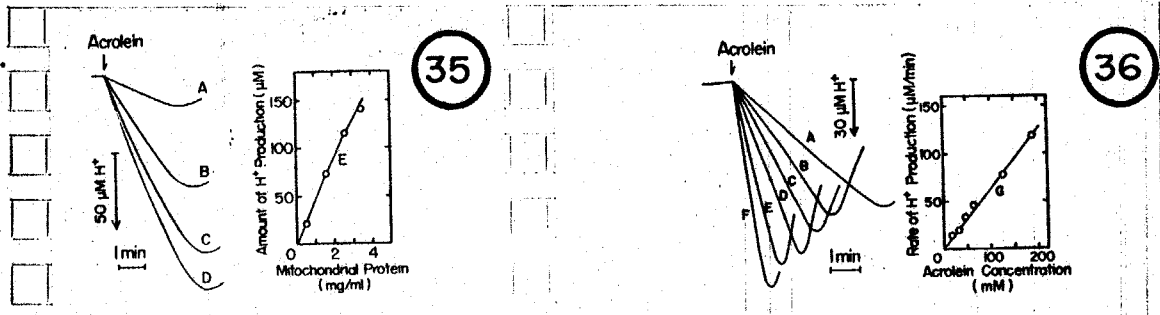


Fig. 35. Relation between the amount of H^+ produced from the mitochondrial membrane by the addition of 50 mM acrolein and the mitochondrial protein concentration. Curves A, B, C and D, mitochondrial membrane containing 0.6, 1.6, 2.6 and 3.5 mg of protein, respectively. Curve E, plot of the amount of H^+ against mitochondrial protein. pH 7.0, temp. 18 °C.

Fig. 36. The rate of H^+ production from the mitochondrial membrane (3 mg protein/ml) induced by acrolein at various concentrations. Curves A, B, C, D, E and F, H^+ production induced by acrolein at 16, 32, 47, 65, 128 and 188 mM, respectively. Curve G, relation between rate of H^+ production and acrolein concentration. Substrate, 2 mM succinate. pH 7.0, temp. 18 °C.

作用部位の異なる阻害剤 (p4, 図 6 参照) を用いてミトコンドリアとアクリロレインの反応を検討した結果を表 IV 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リロレイン添加による H^+ 放出を完全におさえるが、X~Y の生成を阻害しないオリゴマイシンはアクリロレインによる H^+ 放出にも何ら影響を与えない。従ってアクリロレインとの反応による H^+ 放出はミトコンドリアの高エネルギー状態と密接に関連していることがわかった。

Table IV. Effect of inhibitors on acrolein-induced proton ejection from mitochondria.

Inhibitors	Succinate	β -Hydroxybutyrate
Azide(1 mM)	+	+(effective)
Antimycin(0.5 μM)	+	+
2-Thenoyltrifluoroacetone(1 μM)	+	+
Rotenone(1 μM)	-	+
CCCP(1 μM)	+	+
Oligomycin(2 μg/ml)	-	-(ineffective)

* H^+ の放出が一定値に達した後に、もどり(pHの上昇)がみられるがこれはホII章(p20)で検討した H^+ 勾配のこわれに相当するものと思われる。

§3. 電子伝達系に与えるアクロレインの影響

先の図34 (p40) にはアクロレイン修飾によってミトコンドリアの呼吸がどのように影響されるかを調べた結果 (曲線C) も同時に示してある。pH X-ターの記録Aと酸素電極の記録C (図34) とを対比させると呼吸基質であるコハク酸存在下における呼吸はアクロレイン添加によってもしばらくの間、ほとんど影響されないが、 H^+ 放出の完結と前後して阻害されることがわかる。このようにアクロレインによってミトコンドリアの呼吸 (state 4) が最初の2分間程、ほとんど影響されないことは、反応の初期ではエネルギー転移系が特異的に修飾され、電子伝達系は修飾されにくいことを示している。

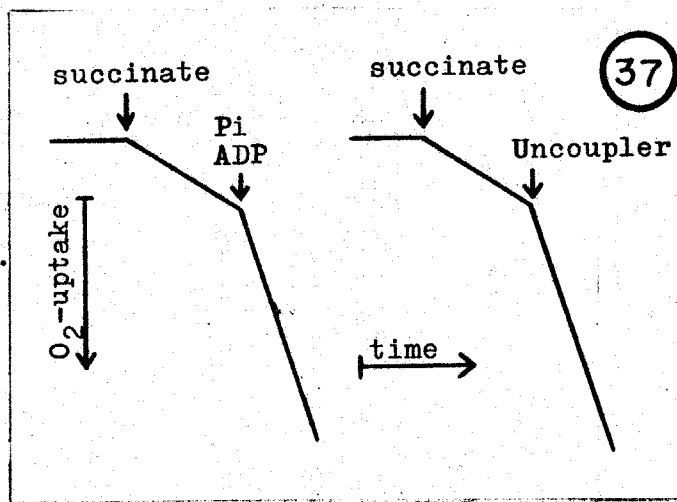


Fig.37. The phenomenon of respiratory control.

ミトコンドリアの電子伝達系は呼吸基質の有無や酸素の有無、さらにはADPと P_i の有無によって異なる状態を取りますが、通常の実験条件下で呼吸速度を測定すると左図37のような二つの大きく異なる状態、すなわち、state 4とstate 3とが識別される。呼吸基質を添加した状態をstate 4と111、これ

にADPと P_i を加え呼吸が促進された状態をstate 3と呼んでいる。II章の序 (p10) でも述べたようにアンカップラーによっても呼吸はstate 3と同程度にまで促進される。state 4からstate 3へと111う大きな機能変化はそれに対応したミトコンドリア膜のコンホメーション変化を想定させるが、実際にstate 4とstate 3のミトコンドリアにアクロレインを反応させると、図38に示すように電子伝達系の修飾され方が異なる。すなわち、高エネルギー状態

* 一般に respiratory control と呼ばれ、酸化リン酸化の機構を解明する上で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)。

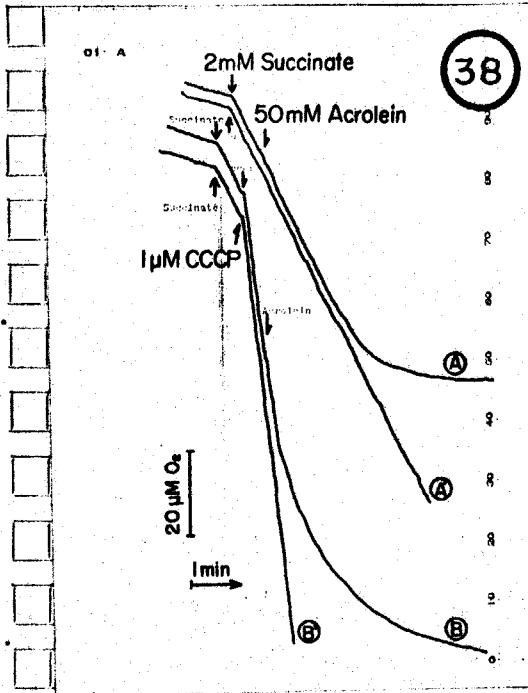


Fig. 38. Differential effects of acrolein on state 4 (curve A) and state 3 (curve B) respiration. Curves A and B: without acrolein (control). Medium: B. 3.5 mg mitochondrial prot./ml.

に対応する state 4呼吸は曲線 A (図 38) に示すようにアクロレイン添加によってもしばらくの間、ほとんど影響されず、約2分後急速に阻害されるが、一方、脱エネルギー状態に対応する state 3呼吸はアクロレイン添加と同時に除々に阻害される。これらも、高エネルギー化に伴うミトコンドリア膜のコンホメーション変化を支持する結果といえる。

§4. エネルギー依存性の Ca^{2+} イオンの取り込みに及ぼすアクロレインの影響

Ca^{2+} の取り込みに伴う H^+ の放出を測定することによって、ミトコンドリアの

エネルギー依存性 Ca^{2+} 取り込み能を調べる

ことができる (図 39, 曲線 A)。この時

放出される H^+ 量と添加した Ca^{2+} 量との間

には、ほぼ 1:1 のモル比が存在することが知られている*。アクロレイン処理した

ミトコンドリアについて、反応の各段階で Ca^{2+} を添加してその取り込み能を調べた結果を

図 39, 曲線 B に示した。反応の進行

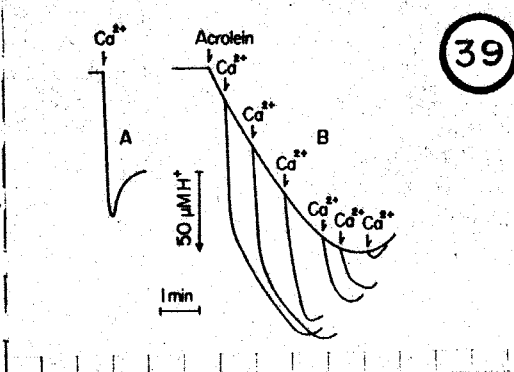


Fig. 39.

Effects of Ca^{2+} on the process of the acrolein-induced H^+ production from the mitochondrial membrane (Curve B). 3.5 mg protein/ml, 2 mM succinate, 50 mM acrolein and 50 μ M Ca^{2+} were used. pH 7.0, temp. 18 °C. Curve A, H^+ ejection into the medium when adding Ca^{2+} to the mitochondrial suspension with 2 mM succinate.

* 実験系に膜透過性の陰イオンが存在する場合や外液のイオン強度が高いときはこの比よりずれることもある [151, 228]。

とともに Ca^{2+} イオンの取り込み能は除々に阻害され、 H^+ の放出がみられなくなつた時点で完全に阻害されることがわかる。

§1 の基礎実験をもとに、§2 ~ §4 では H^+ 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 H^+ 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、脱エ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 H^+ 放出として観察されない、(ii) アクロレイン修飾に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 H^+ の放出として観察されているという可能性もあり、正確には反応生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ぬが、発色団を有しない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薬として知られているダンシルクロライドを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ルギー状態における反応性の差異を確かめようとしたのが以下の実験である。

Ⅲ-3-2. ダンシルクロライドによるミトコンドリアの修飾

§1. ダンシル化に伴うミトコンドリアの形態変化

図40 ④ に、ラット肝ミトコンドリアの典型的な電子顕微鏡写真を示す。矢印 OM, IM はそれぞれ外膜, 内膜を示している。写真 ④ で示される高エ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、写真 ⑤ 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散乱変化として、図41 のように分光学的にとらえることも可能である。

* このこ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まで達しているものと推定される。

た2段階の形態変化 (ΔA_{540} , 例えば曲線D) がみられることも興味あることである。

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シンAを添加しミトコンドリアを脱エネルギー化した場合の吸光度変化 (ΔA_{540}) に及ぼす影響を図42に示した。アンチマイシンの添加がはやければはやいほど、その阻害効果も大きいことがわかる(曲線B, C, D)。

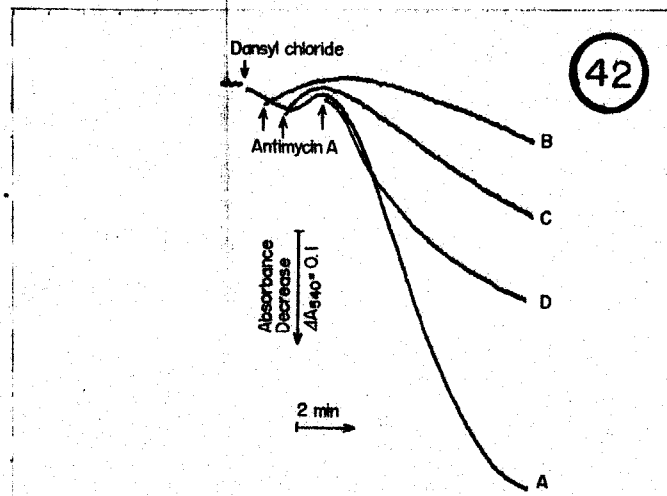


Fig. 42. Effect of antimycin A on the dansyl chloride-induced absorbance decrease. Curve A: without antimycin A. Curves B, C, and D: addition of $0.5 \mu\text{M}$ antimycin A at the points indicated by arrows. 20°C .

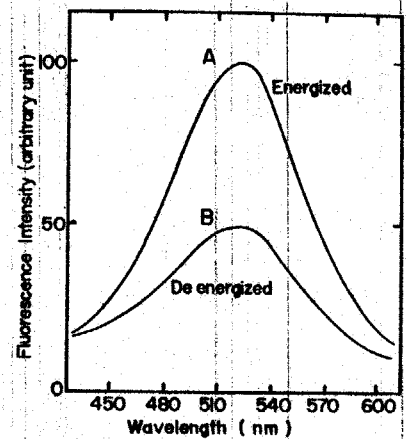


Fig. 43. Fluorescence spectra of dansyl chloride reacted with mitochondria. Curves B and A: 2 mM succinate, $2 \mu\text{M}$ rotenone in the presence and the absence of $1 \mu\text{M}$ CCCP. Fluorescence spectra of dansyl chloride reacted with mitochondria were measured after solubilizing and dialyzing the dansyl chloride-modified mitochondria.

§2. ミトコンドリアに反応したダンシルクロライドの定量

前節で「高エネルギー状態のミトコンドリアは脱エネルギー状態のものに比べ、ダンシルクロライドによる修飾を受けやすい」ということを示唆する結果を示したが、このことを確かめるために反応量の検討を試みた。図43がその結果であるが、実際に高エネルギー状態の方がダンシル化されやすいことが確かめられた。現在、ダンシル化された部位の決定を精力的に進め、興味ある事実を見出しつつある(考察, p49, 図44参照)。

Ⅲ-4. 考察

Ⅲ-4-1. アクロレインによる修飾

アクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$) は電子顕微鏡用試料の固定剤として用いられてゐるが、その際、固定液の pH 低下が起こることが知られてゐた。この点に着目してアクロレインが化学修飾試薬としても有用であることを示すことができた。実験操作が簡単であり、かつ生理的条件下で行へることより、特に膜系 (生体内顆粒) の修飾に適してゐると思われる。反応機構に関しては検討を加えなかったが、ホルムアルデヒド (HCHO) の場合に関してアミノ酸およびタンパク分子との反応が詳しく調べられてゐる [229] ので参考になるであろう。Fortes [199] はグルタルアルデヒド ($\text{OHCCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})$) を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探るうとしてゐるが、グルタルアルデヒ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薬とはいえない。二重結合を有するアクロレインは酸化されなることが Packer ら [230] によって明らかにされてゐる。蛋白分子中のアミノ基とリン脂質中 (ホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルセリン) のアミノ基がどのような割合で修飾されてゐ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、分析の容易なダンシング化したミトコンドリアの場合について進めつつある (次節参照)。

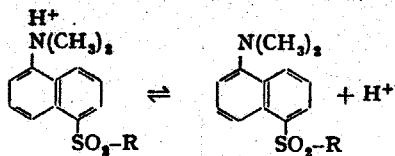
電子伝達系の初期 (例えば、コハク酸脱水素酵素の機能発現) には SH 基が重要な役割を果してゐることが知られてゐる [231]。アクロレインは巯基とも反応することを示した (p39, 表Ⅲ) が、電子伝達系の阻害はこの SH 基とアクロレインとの反応によるものと思われる。結果には示さなかったが、実際にアクロレイン修飾を受けたミトコンドリアでは DTNB によって検出される SH 基は減少してゐることが確かめられた。

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 ATP の合成に関与すると考えられる F_1 分子が内膜のマトリックス側 (p4, 図4)

に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一つの重要な要素であると思われる。本研究で用いたアクロレイン、ダンシルクロライドをはじめ最近の報告にある修飾試薬は大部分脂溶性である。もちろん、膜の外側表面のみを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いる必要がある。最近、光化学反応を利用する修飾法^[126, 187, 211]および反応生成物のみケイ光を有する修飾試薬が開発された^[226, 232, 233]。これ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われる。

Ⅲ-4-2. ミトコンドリアのダンシル化

ダンシ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に欠くことのできない試薬となっている^[222, 222b]。修飾試薬としての反応性も十分に調べられており、SH基およびプロトネーションしているアミノ基 $(+NH_2)$ 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ジンのイミダゾール基、チロシンのOH基とも反応する)。アミノ基との反応生成物



は強酸性下でも安定であるが、ダンシル分子中のジメチル化されたアミノ基がプロトネーションした状態(酸性)ではケイ光を発しない^[234]ので注

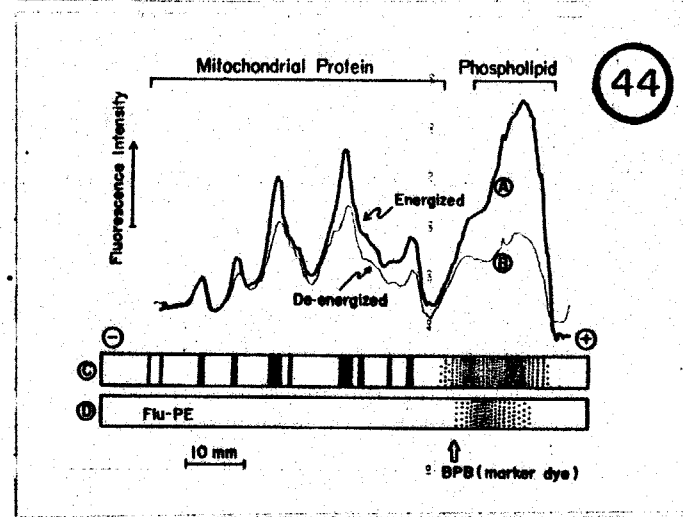
意が必要である。上図にこの様子を示した。

ミトコンドリアにダンシ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ことより、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を明らかにするこ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現在検討中であるが、SH基とアミノ基が修飾されていることが認められた。^{*}

* DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); SH基と反応), TNBS (trinitrobenzene sulfonate; NH_2 基と反応) で未反応のSH基, アミノ基を調べ算出した。他の残基については未検討。

SH基は電子伝達系^{*}、エネルギー転移系をはじめとして、リン酸イオンの膜透過 (Pi Carrier^{**}) や K⁺ イオンの輸送 (K⁺ carrier^{***}) にも重要な役割を果していることが知られている。ダンシル化の途中で観察された2段階の吸光度変化 (p46, 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、すなわち可逆的であること、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、解析を進めている。

図42 (p46) に示された2段階目の大きな吸光度変化については、アミノ基の反応に基づくものではないかと推定している。この場合修飾されるものとしては、蛋白分子中のアミノ基とリン脂質 (ホスファチジルエタノールア



44
 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) 中のアミノ基が考えられるが、予備的な実験によれば上図44に示すように、リポドがかなりの割合で修飾されていることがわかった。SDS ティン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。リポドの修飾により膜構造が大きく変化することは容易に想像できる [162]。また、リン脂質はエネルギー転移系にとっても欠くことのできな存在であることも示されてお

* アクロレインの項参照。ただしダンシルクロライドの場合は 50 μ M (50 μ moles / g 蛋白) でも電子伝達は阻害されなかった。
 ** Pi 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]。

[237-²¹⁸239], 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何に対応するかという帰属と同一性が現在盛んに進められつつある[240-242]。近い将来に上記のケイ光スキャンニング(図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われる。

第三章ではアクロレインとダニツルクロライドを用いた化学修飾法によりミトコンドリアの高エネルギー化に伴うコンホメーション変化を明らかにしリポドの関与を推定した。エネルギー転移系における大きなコンホメーション変化を証明した他の例としては Jagendorf ら[219]の仕事がある。彼らは、葉緑体をトリチウム水($^3\text{H}_2\text{O}$)中に懸濁し、光照射後、EDTA処理によって葉緑体膜からATPaseを分離し、トリチウム化された量を調べ、その値を暗においたコントロールのものと比較することにより、ATPase分子に極端な高次構造変化が起きていることを明らかにした。葉緑体やミトコンドリア膜中の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 synthetase complex

IV 要 旨

ミトコンドリアは細胞内におけるエネルギー産生のものであり、生命現象に必要なATPの大部分を作り出している。その内膜にはエネルギー変換に関与する酵素群が複雑かつ巧妙に配列されており、呼吸によって遊離したエネルギーをATPという形に変換し、保存する。この酸化リン酸化現象の発見は比較的古いが、その機構に関しては未だに不明の点が多い。本研究ではミトコンドリアにおけるエネルギー変換過程の初期にみられるミトコンドリア膜の高エネルギー化の機構を解明することを目的として、色素および化学修飾法による解析を試み、脱エネルギー状態のミトコンドリアと高エネルギー状態のミトコンドリアでは、膜内電荷およびアミノ基の存在状態に大きな差異のあることを明らかにした。さらに、高エネルギー化の裏面として重視されてきた脱エネルギー化の機構、すなわち、除共役剤の作用機構に関しても興味ある結果を得ることができた。

(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 (II章)

ローダミン6Gの水溶液にテトラフェニルボロン、ペンタクロロフェノールなどの脂溶性アニオンを添加すると著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これ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6Gが膜内電荷探索試薬として有用であることを見出した〔8〕。ピナツアノールもローダミン6Gと似た挙動を示す〔12〕。これらカチオン性色素とミトコンドリアの相互作用を検討した結果、ローダミン6G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を変化し、阻害剤添加による脱エネルギー化とともに遊離し元のスペクトルにもど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答の差異は、膜内電荷近傍の大きなコンホメーション変化を反映しているものと推定される。

(2) カルボニルシアニドメタクロロフェニルヒドラゾン (CCCP) の作用機作の解析 (II章, 3節の3, p20)

高感度 pHメーターを用いた検討より, 脂溶性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^+ が外液中へ放出され, 逆に ④: 阻害剤によって色素が遊離すると H^+ がミトコンドリア内へ取り込まれることがわかった。一方, ⑤: 除共役剤である CCCP を高エネルギー状態のミトコンドリアに添加すると, その H^+ 伝導作用により, 膜を隔てた H^+ 勾配がニわかれ外液の pH が上昇することが知られている。脂溶性カチオンを結合したミトコンドリアに対する CCCP の作用を検討中に, 上記 ④, ⑤ の過程を分離してとらえ得ることを見出し, CCCP が単に H^+ 伝導体としてのみ作用しているのではないことを明らかにした [82]。同様のことは, バリノマイシン・ K^+ および, Ca^{2+} イオンの取り込みの際にも観察された; エネルギー依存性の Ca^{2+} 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, それと同時に一旦取り込まれていた Ca^{2+} イオンが遊離するが, H^+ 勾配のニわかれは少し遅く, 無酸素状態になってはじめて起こる。続く酸素供給によって, CCCP の存在下であるにもかかわらず, 再び H^+ 勾配が形成され得るという事実も興味ある結果であり, CCCP の作用機作のみならず, 呼吸に依存した H^+ 放出反応の解明にも大きな手がかりを与えるものである。

(3) アミノ基修飾試薬による高エネルギー状態の探索 (III章)

アクロレイン ($CH_2=CHCHO$) はアミノ基と反応し, アミノ基の pKa 値を低下させる。pKa 値の低下は H^+ の放出を伴うので, pHメーターによりアクロレインとアミノ基の反応を容易に追跡できることを見出し, ミトコンドリアへの応用より膜のエネルギー状態によってアミノ基の状態に著しい差異のあることを明らかにした。すなわち高エネルギー状態のミトコンドリアの方がアクロレイン修飾を受けやすい [170]。この反応性の差異はダンツルクロライドによる修飾によっても確かめることができ [178], アミノ基を有するリン脂質の寄与を推論した。

謝 辞

本研究を進めるにあたり良き指導と御鞭達を賜わった稲田祐二先生および本
学生物化学教室の皆様に深く感謝いたします。また電子顕微鏡を用いた仕事に
関しては、昭和大学の中村泰治先生および牛渡明子さんの助言と協力を得た。
あわせ謝意を表します。

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, 萩原文二(1972) 蛋白質・核酸・酵素 17, 915-926
- 11 香川靖雄(1973) 化学 28, 497-505. b) 村岡三郎, 寺田弘(1973) 蛋白質・核酸・酵素 18, pp.911-929
- 12 稻田祐二(1973) 蛋白質・核酸・酵素 18, 702-709
- 13 山内脩(1974) 化学増刊 61, 161-177; b) 高木雅行(1973) 化学増刊 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 Mitochondrial 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('74)
- 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

- 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., Hancock, 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
- 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
- 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 柳沼伸次(1973)修士論文, 東京工業大学, 化学科
- 147 Gear, A.R.L.(1974) J. Biol. Chem. 249, 3628-3637
- 148 Bouni, A., Luciani, S. and Contessa, 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 八木国夫, 吉田善一, 太田権利 - (1958) 螢光, p177, 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 赤松稜, 浅野朗, 安樂泰宏, 大村恒雄, 藤田道世, 水島昭二 (1974) 生体膜実験法(上,下) (蛋白質・核酸・酵素別冊)
- 165 大西 勁糸編 (1967) 生体膜実験技術, 南江堂
- 166 柴田和雄 (1969) 高次構造の化学的研究法, 東大出版会
- 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

[化学(1973) No 8 ●]
[化学(1974) No 10, p819]

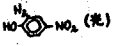
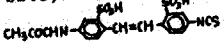

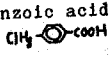



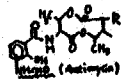
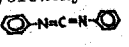


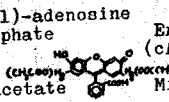
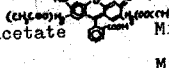

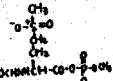
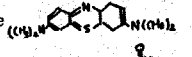
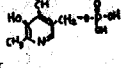



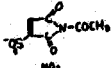
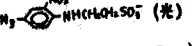
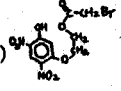

- 170 Hirose, S., Tamaura, Y., Iida, K. and Inada, Y. (1973) Biochim. Biophys. Acta 305, 52-58
- 171 Maddy, A.H. (1964) Biochim. Biophys. Acta 88, 390-399
- 172 Khanwala, A.S. and Kasper, C.B. (1971) Biochim. Biophys. Acta 233, 348
- 173 Scott, K.M., Knight, V.A., Brierley, G.P. (1970) Biochemistry 9, 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., Knüfnerman, 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 Quagliariello, E. (1974) Biochim. Biophys. Acta 333, 195-208
- 185 Senior, A.E. (1973) Biochemistry 12, 3622
- 186 "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. (JBC 249, 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. c) Channell, J.B. (1969) in Ref. 190, pp. 335-350

- 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) 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

- 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, pp121-138
b) 田村善哉, 中島輝躬(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 Chowles, G.L. and Zimm, B.H.(1965) *Anal. Biochem.* 13, 336-344
- 226 Udenfriend, M., DeBernardo, S., Böhlen, P., Dairman, W., I. 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., Maguire, 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, 20D-55D; (50, 5D-19D)
- 245 Glass, R.S., Williams, E.B., Jr. and Wilson, G.S.(1974) 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

Table 2. SOME EXAMPLES of MODIFICATION REAGENTS and THEIR USES

COMPOUND	APPLICATION	REFERENCE
Acrolein $\text{CH}_2=\text{CHCHO}$	Mitochondria	Hirose <i>et al.</i> (170)
2-Azido-4-nitrophenol 	Mitochondria (uncoupler binding site)	(126)
*4-Acetamido, 4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulphonic acid 	Plasma membrane	(171)
N-Bromosuccinimide 	Microsome	(172)
p-Chloromercuribenzoic acid 	Mitochondria (ion transport)	(173)(190)
Difluorodinitrobenzene 	(electron transport) (energy transfer)	(174)(190b)
Dansyl Chloride 	Erythrocytes	(175)(176)
*5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 	Erythrocytes	(246)(177)
Dansyl Chloride	Mitochondria	Hirose <i>et al.</i> (178)
	Erythrocyte	(179)(180)
*5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	Chloroplasts	Hirose <i>et al.</i> (181)
	Mitochondria	(28)(182-185)
1-(5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonylamido) propane-3-trimethyl ammonium iodide 	Cholinergic receptor	(186)
Deformamido azido antimycin A (光)	Mitochondria (antimycin binding site)	(187)
*Diazonium-benzenesulfonic acid	Chloroplasts (photosystem II)	(188)
	Mitochondria, Liver cell	(208-210)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide 	Mitochondria	(189)(190)
	Bacterial membrane (ATPase)	(191)
Diazonium-1,2,4-triazole 	Chloroplasts (photosystem I)	(192)(193)
N-Ethylmaleimide 	Chloroplasts (coupling factor 1)	(194)
	Mitochondria (ion transport)	(173c)(28)(190c)
N-(Ethyl 2-diazomalonyl)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphate 	Erythrocytes (cAMP-receptor)	(195)
Fluorescein mercuric acetate 	Mitochondria	(196)(197)
Fluorescamine 	Mitochondria	Hirose <i>et al.</i> (澤藤中)
*Formylmethionyl sulphone methyl phosphate 	Erythrocytes	(198)
Glutaraldehyde $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$	Mitochondria	(199)
*Galactose oxidase	Erythrocytes (sugar)	(200)
Methylene blue 	Mitochondria (AdN carrier)	(28)
Mersaryl	Mitochondria	(183)(190b)
*Pyridoxal phosphate 	Virus (membrane protein)	(201)
*Peroxidase + H_2O_2 + ^{135}I	Erythrocytes	(202)
Permanganate ion MnO_4^-	Chloroplast	(203)
2-Phenylindolone 	Mitochondria	(204)
Selenium	Mitochondria	(205)
Tetranitromethane 	Mitochondria	(185)
	Insulin receptor	(206)
	Microsome	(172)
Tellurite TeO_3^{2-}	Mitochondria	(207)
Trinitrobenzenesulfonic acid 	Mitochondria	(220)
N-Acetyl-4-sulfonylmaimide 	Mitochondria (Pi carrier)	(183)
N-(4-azido-2-nitrophenyl)-2-aminoethylsulfonic acid 	Erythrocyte	(211)
*Proteolytic enzymes	Mitochondria (electron transfer)	(25)(212)
	Chloroplast	(213)
	Erythrocyte	(162)(247)
2,4-Dinitro-5-(bromoacetoxyethoxy) phenol 	Mitochondria (uncoupler binding site)	(214)(215)
Water-soluble carbodiimide; (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimide)	Chloroplast (electron transfer chain)	(216)
*Neuraminidase	Erythrocyte	(162)(217)
*Phospholipases 	Mitochondria	(218)
	Erythrocyte	(162)
7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole	Mitochondria (NBD-Cl, Anal. Biochem.)	53(173)290 (243)