2P233

ミトコンドリアの水の透過性

○菌田 武嗣、葛西 道生（龍谷大院・理工・物質化学）

水分子の膜透過性制御は細胞レベルばかりでなく、臓器・個体レベルでも非常に重要である。腎臓では99%の水分子が尿細管から体内へと再吸収されており、水チャネルが同定されている。そこで、我々はミトコンドリア膜の水の透過性を研究することにした。本研究はストップフロー分光光度計を用い、ストップフロー法により単離したミトコンドリアベシクルの光散乱強度変化を測定することで水の透過性を調べた。水の透過は低張液に浸したミトコンドリアベシクルに高張のショ糖溶液を混合しベシクルの収縮速度から測定した。水の透過は水チャネルを通ると考えられるので、水の透過に及ぼす種々のファクターの影響を調べた。その結果、40℃の熱処理を行った膜ベシクルは透過に変化はなく、この程度の熱による変性は起こらないと考えられる。次にtrypsin、chymotrypsinなどのプロテアーゼ存在下での効果を室温で調べた。その結果、プロテアーゼの効果は見られなかった。さらに40℃でのプロテアーゼ効果を調べた。その結果、trypsinは水の透過が速くなったが、chymotrypsinなどの他のプロテアーゼでは透過に変化は見られなかった。また、酸化剤、thimerosal、還元剤、DTT、の効果調べた。その結果、酸化状態では透過が遅くなり、還元状態では変化が見られなかった。このことから、通常は還元状態にあり、酸化されることで透過を抑制していると考えられる。

T.Sonoda, T.Kasai : Permeation of water in mitochondrial membrane

2P235

動物細胞におけるヘムの輸送について

○奈良 麻利子¹、佐藤 雅俊²、城 宜嗣³、中村 寛夫^{2,3}（¹ 日女・理、² 横市大院・総合理、³ 理研）

〔目的〕ヘムは食物中から小腸刷子縁細胞へ、また血液中から肝細胞や赤芽細胞などの細胞に取り込まれることが知られている。その取り込み機構には特異的な輸送体を經由するという考えと受動拡散という考えがあるが、現在もお不明な点が多い。そこで、ヘムの蛍光類似体である亜鉛ポルフィリン (ZnMP) を用いて、ヒト肝癌細胞由来細胞 (HepG2) においてヘムの取込みに特異的な輸送体が存在しているかを調べた。〔方法・結果〕1) 温度依存性を調べるために ZnMP 取り込み時の温度を変えたところ、37℃では取り込みが見られたが、4℃ではほとんど見られなかった。2) ZnMP の取り込み時間を30分間と1時間に設定し温度依存性を調べたところ、1時間の方が多くの ZnMP を取り込んでいた。3) 糖代謝および呼吸の阻害剤を用いて、細胞内のエネルギーレベルを低下させる条件で実験を行ったが、有意な変化は見られなかった。4) ZnMP 取り込み時のバッファの pH を変えたところ pH 依存性が認められ、至適 pH は 7.0 付近であった。5) タンパク質中のヒスチジン修飾剤 (DEPC) と、システイン修飾剤 (NEM) で細胞を化学修飾し、取り込み量を調べた。その結果 NEM においては取り込み量に顕著な変化は見られなかったが、DEPC では著しく取り込み量が低下した。6) ヘムの前駆体であるアミノレブリン酸 (ALA) と、ヘム合成阻害剤であるスクシニルアセトン (SA) を含む培地で細胞を培養し、取り込み量を調べたが、有意な変化は見られなかった。〔考察〕本研究の結果は、ヘムの細胞内輸送には特異的なタンパク質が関与していることを強く示唆する。しかし、ヘム輸送にどのようなエネルギーが利用されるのかは断定できなかった。取り込み量の違いが現れる条件を検討し、輸送に関与するタンパク質を同定することが、今後の課題である。

M.Nara, M.Sato, Y.Shiro and H.Nakamura : Characterizations of heme transport in animal cells

2P234

ウサギ骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase は二量体で機能する。

○丑丸 真、福島 義博（杏林大・医・化学）

ウサギ骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase が膜上で二量体として存在していることは、蛍光エネルギー移動、電子顕微鏡観察等から明らかにされている。しかし、機能単位が単量体か二量体なのかについては未だに結論が得られていない。二量体が機能単位であるならば、 Ca^{2+} -ATPase 分子間に機能に必須の相互作用が存在するはずである。この分子間相互作用の有無を明らかにするために、FITC 標識不活化 Ca^{2+} -ATPase (FITC-ATPase) と活性 Ca^{2+} -ATPase (N-ATPase) とから成るヘテロ二量体の活性を観察した。ヘテロ二量体を形成させるため、上記二種類の Ca^{2+} -ATPase が共存する融合膜小胞を、polyethylene glycol を用いて調製した。FITC-ATPase と N-ATPase を 1:1 で共存させた融合膜小胞を調製し、ATP 加水分解活性、 Ca^{2+} 輸送活性を測定した。それらの比活性は、N-ATPase のみを含む融合膜小胞のそれぞれの比活性の 25% であった。 Ca^{2+} -ATPase 二量体が膜面上で解離会合平衡にあり、単量体の組合わせを無作為に替えると仮定すると、FITC-ATPase のホモ二量体、FITC-ATPase と N-ATPase のヘテロ二量体、N-ATPase のホモ二量体それぞれの存在比は 1:2:1 となる。上記の活性は、N-ATPase ホモ二量体（全体の 25%）のみが活性を有し、ヘテロ二量体は活性を失っていることを示している。これは、活性 Ca^{2+} -ATPase 分子間には相互作用が存在し、不活化した分子とはこの相互作用が起こらないためヘテロ二量体の活性が失われたと考えられる。従って、機能発現には分子間相互作用が不可欠であることが示された。膜面上の Ca^{2+} -ATPase は、解離会合平衡にある二量体を機能単位として機能する。

M.Ushimaru and Y.Fukushima : Functional interaction between sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases

2P236

ATP 加水分解 ΔG 値は ATPase の行う仕事量を規定しない

○福島 義博、丑丸 真（杏林大・医・化学）

ATP は生物界での自由エネルギー貯蔵体といわれ、ATP 加水分解により解放される自由エネルギー ΔG が ATPase の行う仕事のエネルギー源であると解されている。事実、ATPase の仕事効率、仕事量/ ΔG で計算される。言い換えれば、 ΔG 値が ATPase の行う仕事の上限を規定するのである。永く信じられているこの ΔG コンセプトは、熱ゆらぎ重視のエネルギー変換機構の定式化においてすら依然強固である。

我々は以下の実験により、このコンセプトの無効を主張する。

実験材料は骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase。実験は、いわゆる低エネルギー化合物 pNPP と Ca^{2+} -ATPase から、いわゆる高エネルギー化合物 ATP が生成された、というものである。各実験条件における pNPP および ATP の加水分解 ΔG 値が変化しても、それによって ATP 生成量は全く影響を受けなかった。したがって、加水分解 ΔG とは独立のエネルギー項が存在しなければならない。

なお、今では古典的実験となった Na^+ , K^+ -ATPase や Ca^{2+} -ATPase の逆反応による ATP 生成とは違い、本実験では、リガンド濃度のジャンプは与えていない。故に我々は、リガンドの結合エネルギーによる ATPase のコンホメーション活性化説を従来の意味では本実験に採用しない。

ATP の高エネルギー性については諸解釈が提出された。しかし、熱運動という別エネルギーの有効性が明らかな現在、 ΔG コンセプトは万能ではない。負の ΔG ($\approx -50 \text{ kJmol}^{-1}$) の意義は、量的に ATPase を活性化することではなく、反応を継続・非平衡を維持することである。我々は熱力学データに忠実に $\Delta G^0 = 0$ を ATP 固有のエネルギーと承認し、プライム付き $\Delta G^0' \approx -30 \text{ kJmol}^{-1}$ は人為的定義だとして退けるに至った。

Y.Fukushima and M.Ushimaru : Irrelevance of the Free Energy Change of ATP Hydrolysis as the Energy Source of Work by ATPase