車軸藻類の原形質膜における起電機構 — 細胞内灌流法を用いての研究

東京大学理学部 新免輝男・田沢 仁
植物学教室

1. はじめに

植物における電気生理学は主として膜のイオンに対する受動的透過性、膜興奮および膜興奮によって制御される植物の運動等の解明を目的としていた。しかしながら化学浸透説¹¹⁾の発展に伴い植物細胞の電気生理学も新しい局面をむかえている。すなわち多くの植物原形質膜には起電性 H^+ ポンプが存在することがわかってきた。⁴⁾¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁹⁾さらに原形質膜を介して形成された H^+ の電気化学ポテンシャルがイオン、糖、アミノ酸の輸送に利用されていることを示す実験事実も増えつつある。¹⁵⁾

車軸藻類の節間細胞は最も頻りに電気生理学の研究に利用されてきた。これは節間細胞が巨大で円筒形をしているために(直径1 mm, 長さ十数cmにも達する)取り扱い易いことが一つの理由としてあげられる。また車軸藻類が膜興奮性を持つことも研究者の関心をひいてきた。北里¹⁰⁾が *Nitella* に起電性 H^+ ポンプが存在することを示唆して以来これを支持する報告が多く出ている。ここでは細胞内灌流法を用いて車軸藻類の細胞内化学組成を任意に制御することによって得た起電機構についての知見を紹介する。実験には *Chara australis* (オーストラリアシャジクモ), *Nitellopsis obtusa* (ホシツリモ), *Nitella axilliformis* (ミルフランスモ) の節間細胞を用いている。

2. 細胞内灌流

a. 灌流法: 神谷と黒田⁷⁾は車軸藻類に細胞内灌流法を適用できることを示したが、田沢²²⁾はこれを改良し実用的なものとした。以後より簡単な方法へと改良されてき

た。²⁵⁾ここでは我々が通常用いている方法について簡単に紹介しておく。アクリル樹脂の灌流台上に細胞を横たえ細胞の両端を灌流液でおおう。細胞の両端をハサミで切ったあとで灌流台を傾けると、一方の灌流液が細胞内に流れ込み、他方から天然細胞液が流出する。完全に灌流が終わったところで細胞の両端を糸でくくる。このようにして得られた灌流細胞の電位測定は微小電極法で行なう。外液にはそれぞれ0.1 mMのKCl, NaCl, $CaCl_2$ を含む人工池水を用いる。また簡便のために外部電極法として K^+ 麻醉法¹⁶⁾を用いることもある。膜電位を測定しながら細胞内を灌流する場合はopen-vacuole法(OV法)²⁴⁾を用いる。

b. 原形質灌流(図1): 成長した植物細胞の中央部はほとんどが液胞によって占められている。

車軸藻類の節間細胞もこの例外ではない(図1a)。そのために上に述べた灌流によって人工液と置換されるのは細胞液である。灌流液に1 mM以上の Ca^{2+} を加えておくと灌流後も液胞膜は健全に保たれる(液胞灌流 図1b)。しかし液胞灌流法では原形質の化学組成

図1 車軸藻類節間細胞の縦断面図。a)正常細胞, b)液胞灌流された細胞, c)液胞膜除去細胞, d)液胞膜消失後二回目の灌流をされた細胞。cw:細胞壁, pl:原形質膜, tp:液胞膜, vac:液胞, en:原形質内質, chl:葉緑体。

を制御することはできない。灌流液から Ca^{2+} を除き、逆に Ca^{2+} のキレート剤を加えると液胞灌流後液胞膜がこわれて灌流液が細胞内全体に分散する（液胞膜除去

mM）の平衡電位ですら -170 mV なののでイオンの拡散電位では実測電位を説明できない。Mg・ATP液による灌流で液胞膜を除去してもこの値は変わらない。HK液で

表1 灌流液の組成

	Mg	灌 流 液		HK	CyDTA
EGTA (mM)	5	5	5	5	0
CyDTA (mM)	0	0	0	0	5
ATP (mM)	0	1	0	0	1
MgCl_2 (mM)	6	6	6	6	0
Hexokinase (mg/ml)	0	0	1	0	0
Glucose (mM)	0	0	5	0	0
Buffer (mM)	5 Tris—maleate	5 Tris—maleate	5 Tris—maleate	5 Tris—maleate	5 Tris—maleate
	10 PIPES or	10 PIPES or	or 30 PIPES	or 30 PIPES	
	30 PIPES	30 PIPES			
K^+ (mM)	17—67	21—71	17—67	25—75	
Sorbitol (mM)	200—290	200—290	200—290	220—310	
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	

略 号

ADP; adenosine-5'-diphosphoric acid,
 AMP-PNP; adenylyl imidodiphosphoric acid,
 ATP; adenosine-5'-triphosphoric acid,
 CyDTA; 1,2-cyclohexane diamine- N,N' -tetraacetic acid,
 DCMU; 3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea,
 EGTA; ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether)- N,N' -tetraacetic acid,
 HK; hexokinase,
 PIPES; piperazine- N,N' -bis-(2-ethane sulfonic acid),
 PMS; phenazine methosulfate,
 TEA; tetraethylammonium
 Tris; tris(hydroxymethyl)aminomethane

細胞 図1c)。液胞膜除去細胞をもう一回灌流すると細胞内化学組成をより精密に制御できる（図1d）。我々が用いている灌流液の組成を表1に示す。

ATPと Mg^{2+} を含む液胞膜除去細胞を調製するには通常Mg・ATP液を用いる。ATPを含まないMg液で一回灌流しても細胞質からのATPはなくなる。しかし液胞膜消失後もう一度Mg液で灌流すると細胞内からATPが除去される。一回灌流で細胞内からATPを除去するにはHK液を、 Mg^{2+} を除去するにはCyDTA液を用いる。CyDTAは Mg^{2+} とも強く結合する。

3. Mg・ATP依存性膜電位の存在¹⁷⁾

Charaの原形質膜電位は -200 mV 以上ある。最も負の値を持つ K^+ （原形質： 110 mM ²⁶⁾人工池水： 0.1

ATPを除去すると膜電位は約 -100 mV に脱分極する。CyDTA液で Mg^{2+} を除去しても同様の結果が得られる。ATPまたは Mg^{2+} 除去によって消失した分（約 -100 mV ）が $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ 依存性電位（ E_a ）であり、ATPまたは Mg^{2+} 除去後残った電位は拡散電位（ E_d ）である。OV法を用いて液胞膜除去細胞内をMg液とMg・ATP液で交互に灌流すると膜電位はほとんど遅れなしにATP濃度変化に反応し、脱分極と再分極を繰り返す（図2）。

CyDTA液とMg・ATP液での灌流で Mg^{2+} 濃度を変化させても同様の結果が得られる。ATPの類似体であるAMP-PNPは膜電位を維持できない。AMP-PNPはATPaseの活性部位に結合するが分解されないことが知られているので電位発生にはATPが分解されることが必要であろうと考えられる。すなわちCharaの起

図2 細胞内ATP濃度変化に対する膜電位の応答¹⁷⁾ Mg·ATP液で灌流した *Chara* 節間細胞の膜電位をOV法で測定し、膜興奮性を抑えるために外液には5 mMの $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ が加えてある。Mg液とMg·ATP液で交互に灌流を繰り返した。

電性ポンプは Mg^{2+} -依存性ATPase作用を持つことが示唆される。

4. 電位発生に関与するATPaseの性質

Nitellopsis の液胞膜除去細胞内を種々の濃度のATPを含むMg液で灌流してATP濃度とATP依存性電位の関係を求めるとポンプ活性は100 μM でほぼ飽和している¹³⁾。

Slaymanら¹⁹⁾はアカパンカビ菌糸を呼吸阻害剤で処理した時のATP濃度変化と膜電位変化を解析して電位発生に対するATPの半飽和濃度は2 mMであると報告している。またアカパンカビの原形質膜から分離された H^+ ポンプと思われるATPaseのATPに対する半飽和濃度は1.8 mMである²⁾。このように同じ H^+ ポンプでも種によって基質に対する親和性には大きい違いがある。

vanadateは $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPaseやdynein ATPaseの特異的な阻害剤として知られている。またvanadateはアカパンカビにおいて原形質膜 H^+ -ATPaseを阻害するがミトコンドリアのATPaseは阻害しない¹⁾。ダイコンの芽ばえにおいては外液にvanadateを与えると膜電位の脱分極が起こる³⁾。ところで*Nitellopsis*では外から1 mMのvanadateを与えても膜電位はほとんど影響を受けないが、液胞膜除去細胞を用いて細胞内からvanadateを作用させると脱分極が起こる²⁸⁾。半阻害濃度は約5 μM である。

ADPは電位発生に無効であるだけでなく¹⁷⁾ ATPによる電位発生を阻害する¹³⁾²⁰⁾。図3に於ては*Nitellopsis*の膜電位をOV法で測定し、種々の濃度のATPとADPを含む液で灌流を繰り返した。

最初細胞内には1 mM ATPが含まれているので膜電位は大きい(a)。次にMg液で灌流すると脱分極が起こる(b)。この変化分がATP依存性電位である。Mg·ATP液で灌流すると再分極が起こる(c)。次に5 mM ADPを含むMg·ATP液で灌流するとATP依存性電位が阻害され脱分極が起こる(d)。1 mM ADPを含むMg·ATP液では阻害は小さい(f)。ADPによるEaの阻害の程度は細胞によって差があるがATPと同量のADPでは平均約30%，5倍量のADPでは約50%である。

図3 *Nitellopsis* におけるATPとADPによる膜電位の制御¹³⁾ Mg·ATP液で灌流した細胞の膜電位をOV法によって測定し、膜興奮性を抑えるために外液には5 mMの $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ を加えた。矢印は灌流の開始を示す。下には灌流液のATPおよびADPの濃度(mM)を示してある。

5. ATP依存性の H^+ 放出¹⁸⁾

起電性ポンプが H^+ ポンプなら当然細胞内ATPに依存した H^+ の放出が予想される。Mg·ATP液で灌流した*Chara*の細胞の外液の酸性化を滴定により H^+ 放出量として求めると58 nmoles/ m^2/sec であった。HK液で灌流した細胞の場合も原因はわからないが19 nmoles/ m^2/sec の H^+ 放出に相当する外液の酸性化が起こった。両者の差の39 nmoles/ m^2/sec がATP依存性の H^+ 放出である。この結果は起電性ポンプが H^+ 放出ポンプであることを支持している。

6. H^+ ポンプの光による活性化

光合成植物を照射すると原形質膜は過分極反応を示す(光電位反応: 図4)¹⁴⁾

図4 *Nitella* 正常細胞における光電位反応。微小電極法で膜電位を測定した。 K^+ チャンネルの関与をさけるために外液には5 mMのTEAが加えてある(原図)。

この原因は光による H^+ ポンプの活性化であると考えられている。事実 *Nitella* では²¹⁾ 光照射で H^+ 放出が促進される。光電位反応の光波長依存性¹⁴⁾や阻害剤の実験⁴⁾から光は光合成を介して原形質膜の H^+ ポンプを活性化するものと考えられている。より直接的な証拠としては遠心処理によって葉緑体をなくした *Spirogyra* (アオミドロ) の細胞では光電位反応が起こらないことが報告されている⁴⁾。

Chara の液胞膜除去細胞でも光電位反応が起こることから光電位反応の座は原形質膜であることがわかる²³⁾ またHK液による灌流でATPを除去した *Chara* 細胞では光電位反応が起きないという事実は⁹⁾ 光電位反応の原因がATPによって駆動されている H^+ ポンプの活性化であるという考えを支持している。では光電位反応時に葉緑体でつくられて原形質膜の H^+ ポンプを活性化する“情報”は何であろうか。まず考えられるのが H^+ ポンプの基質であるATPまたは H^+ 濃度の変化である。*Nitella* の暗中小および明中における細胞体積当りのATP濃度はそれぞれ130 μM および150 μM である。¹²⁾ 全細胞体積のうち原形質が約5%を

占めるとすると暗、明中における原形質中のATP濃度はそれぞれ2.6 mM および3 mM となる。光電位反応を阻害するDCMU⁴⁾もATP濃度を変えない⁸⁾ このようにATP濃度の変化が光電位反応を引き起こしているとは考えにくい。さらに1.3 mM ATPではすでにポンプ活性は飽和している。

Chara に於て原形質のpHが暗中の7.4から光照射によって7.8に変化することが報告されている³⁰⁾ 液胞膜除去 *Chara* 細胞で得た細胞内pHと膜電位の関係を見るとpH7で電位は最も高く、アルカリ側、酸性側どちらに変化しても脱分極が起こる⁵⁾ pHが7.4から7.8へと変化しても数mVの脱分極が起こるのみである。このようにATPや H^+ 濃度変化は光電位反応の“情報”としては考えにくい。細胞内pH⁵⁾やATP濃度⁹⁾を大きく変えていた液胞膜除去細胞でも光電位反応が起こるという事実もこれを支持する。

7. 呼吸による起電性ポンプ活性の制御

植物細胞を無酸素状態におくと脱分極が起こる¹⁹⁾ *Nitellopsis* も無酸素処理によって可逆的な脱分極を起こす(図5)¹³⁾

アカパンカビで報告されたように¹⁹⁾ ポンプの基質で

図5 無酸素処理による脱分極¹³⁾ 材料は *Nitellopsis* の正常細胞。電位測定は K^+ 麻酔法¹⁶⁾で行ない、電位測定部位は温室にした。無酸素処理(N_2)による脱分極時にも電流刺激によって活動電位が発生する。

あるATPの減少によってポンプが停止することが考えられる。ところが *Nitellopsis* では細胞体積当りの濃度は空気中での31 μM から無酸素処理によって15 μM へと変化するにすぎない。原形質が細胞全体積の5%を占めるとすると無酸素下における原形質中のATP濃度は300 μM となり、この濃度ではポンプ活性は飽和している。原形質中のADP濃度は無酸素処理によって260 μM から340 μM に増加する¹³⁾ ATP (300 μM) と等量のADP (340 μM) はATP依存性電位の約30%を阻害するにすぎず、無酸素処理による脱分極の一部

しか説明できない。

8. H^+ ポンプと膜興奮

車軸藻類の活動電位は膜の Cl^- 透過性が一過性に上昇することによって考えられている⁶⁾。しかしながら上に述べてきたように車軸藻類の膜電位には拡散電位に加えて H^+ ポンプにより発生する電位も含まれている。そのために膜興奮時の電位変化には両方の電位が関与している可能性がある。

図6 膜興奮時におけるATP依存性電位の測定。²⁹⁾液胞膜を除去した *Chara* 節間細胞の膜電位をOV法で測定した。

そこで膜興奮時におけるATP依存性電位 (E_a) をOV法により直接測定することを試みた。²⁷⁾²⁹⁾ 図6の実験でまず細胞内をMg・ATP液で灌流すると膜電位は大きく(a)電流刺激により膜電位が閾値に達すると活動電位を発生する(b)。Mg液による灌流を始めたところで活動電位が終わり、電位は静止レベルにもどり始めた(c)。ところが灌流によって細胞内からATPが洗い流されるために再び脱分極が起こり(d)電位が閾値に達して興奮が起こった(e)。この値が E_a を含まない活動電位のピーク値である。次にMg・ATP液で灌流すると少し分極した(f)。この値が E_a を含むピーク電位であり、eとfにおける電位の差が膜興奮時の E_a である。内向き電流により電位は再び静止レベルにもどる(g)。興奮時の E_a の平均値は -9 mV であり²⁷⁾ 静止時の E_a は約 -100 mV であるから、¹⁷⁾ 膜興奮時に E_a は大きく変化しているわけである。ポンプを止めた状態では E_a を

含まず、拡散電位の変化のみから成る活動電位が発生する。無酸素処理による脱分極状態で発生する活動電位はそれである(図5)。 *Chara* の細胞をHK液で灌流し、細胞内からATPを除去すると H^+ ポンプの停止による脱分極と共に膜興奮性の消失が起こる。¹⁷⁾ しながら膜興奮性はATP消失と同時に抑制されるのではなく、 H^+ ポンプ停止によって脱分極した後数分から数十分も維持される場合がある。²⁷⁾ この状態で発生する活動電位も E_a 変化を含まない。

9. おわりに

細胞内灌流法を用いて H^+ ポンプ活性に關与する物質 (H^+ , ATP, Mg^{2+} , ADP, vanadate) の細胞内濃度を制御することにより、 H^+ ポンプに関する新しい知見を得た。

他の研究者達も呼吸阻害下におけるATP濃度減少と脱分極を測定することによりATP濃度と起電活性の関係を調べている。⁸⁾¹⁹⁾ 呼吸阻害下においてATPの一部が加水分解されてADPになった場合にはATPの減少と同時にADPの増加によってATP依存性電位が阻害される可能性が強い(図3)。事実、無酸素処理による脱分極下(図5)において原形質内ATPは 0.3 mM 存在するが、これは起電活性を飽和させるに十分な量なのでこの無酸素下における H^+ ポンプの阻害の一部はADP濃度の上昇によるものと思われる。また阻害剤で脱分極が起こる場合にもATPはポンプ活性を阻害する程には減少しない⁸⁾

膜電位と H^+ 放出が共に細胞内ATPに依存することから、車軸藻の起電機構は H^+ 放出ポンプであることが示唆された。しかしながら電気生理学の実験結果を起電性ポンプを含む膜の等価回路を用いて解析して得られたポンプ電流は正味の H^+ 放出量の2倍も大きい¹⁸⁾ この差は H^+ のinfluxあるいは OH^- のeffluxによるものかも知れない。

光合成による H^+ ポンプの活性化の機構については今のところよくわからない。 *Spirogyra* ではDCMUと共にPMSを与えると光電位反応は阻害されない⁴⁾ 非循環的電子伝達が H^+ ポンプの活性化に關与している可能性もある。この問題は細胞内の化学組成を任意に制御出来る液胞膜除去細胞を用いての実験によって解決できるかも知れない。

正常細胞の活動電位においては拡散電位と共に起電性ポンプにより発生する電位も変化する。植物細胞の

活動電位のイオン機作を解明するには H^+ ポンプの関与をさけて考える必要があるため拡散電位のみから成る膜電位を持った細胞を用いて研究を進めるべきであろう。

文 献

- 1) Bowman, B. J., Mainzer, S. E., Allen, K. E., Slayman C. W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 512, 13–28.
- 2) Bowman, B. J., Slayman, C. W. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2928–2934.
- 3) Cocucci, M., Ballarin-Denti, A., Marre, M. T. (1980) *Plant Sci. Lett.* 17, 391–400.
- 4) Fujii, S., Shimmen, T., Tazawa, M. (1978) *Plant & Cell Physiol.* 19, 573–590.
- 5) Fujii, S., Shimmen, T., Tazawa, M. (1979) *ibid.* 20, 1315–1328.
- 6) Hope, A. B., Walker, N. A. (1975) *The Physiology of Giant Algal Cells*, Cambridge University Press.
- 7) 神谷宣郎, 黒田清子: 日本植物学会第20回大会(広島, 1955年)
- 8) Keifer, D. W., Spanswick, R. M. (1979) *Plant Physiol.* 64, 165–168.
- 9) Kikuyama, M., Fujii, S., Hayama, T., Tazawa, M. (1979) *Plant & Cell Physiol.* 20, 993–1002.
- 10) Kitasato, H. (1968) *J. Gen. Physiol.* 52, 60–87.
- 11) Mitchell, P. (1966) *Biol. Rev.* 41, 445–502.
- 12) 三村徹郎, 新免輝男, 田沢仁: 日本植物学会第45回大会(仙台, 1980年)
- 13) 三村徹郎, 新免輝男, 田沢仁: 日本植物生理学会1981年度年会(札幌, 1981年)
- 14) Nagai, R., Tazawa, M. (1962) *Plant & Cell Physiol.* 3, 323–339.
- 15) Poole, R. J. (1978) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29, 437–460.
- 16) Shimmen, T., Kikuya, M., Tazawa, M. (1976) *J. Membrane Biol.* 30, 249–270.
- 17) Shimmen, T., Tazawa, M. (1977) *ibid.* 37, 167–192.
- 18) Shimmen, T., Tazawa, M. (1980) *Plant & Cell Physiol.* 21, 1007–1013.
- 19) Slayman, C. L., Long, W. S., Lu, C. Y.–H. (1973) *J. Membrane Biol.* 14, 305–338.
- 20) Smith, P. T., Walker, N. A. J. *Membrane Biol.* (in press)
- 21) Spear, D. G., Barr, J. K., Barr, C. E. (1969) *J. Gen. Physiol.* 54, 397–414.
- 22) Tazawa, M. (1964) *Plant & Cell Physiol.* 5, 33–43.
- 23) Tazawa, M., Fujii, S., Kikuyama, M. (1979) *ibid.* 20, 451–460.
- 24) Tazawa, M., Kikuyama, M., Nakagawa, S. (1975) *ibid.* 16, 611–622.
- 25) Tazawa, M., Kikuyama, M., Shimmen, T. (1976) *Cell Structure & Function* 1, 165–176.
- 26) Tazawa, M., Kishimoto, U., Kikuyama, M. (1974) *Plant & Cell Physiol.* 15, 103–110.
- 27) Tazawa, M., Shimmen, T. (1980) *Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues* (Spanswick, R. M., Lucas, W. J., eds.) 349–362, North-Holland.
- 28) 田沢仁, 新免輝男: 日本植物生理学会1981年度年会(札幌1981年)
- 29) 田沢仁, 新免輝男(1981)膜 6, 240–252.
- 30) Walker, N. A., Smith, F. A., (1975) *Plant Sci. Lett.* 4, 125–132.

ABSTRACT

Electrogenic mechanism in Characeae plasma membrane:
Studies by intracellular perfusion

Teruo SHIMMEN and Masashi TAZAWA

Department of Botany, Faculty of Science, University of Tokyo

The chemiosmotic hypothesis has brought new aspects in the plant membrane research. The H^+ -pump of the plasma membrane generates the electrochemical potential gradient of H^+ which is available for transport of ions, sugars and amino acids. Further, the H^+ pump works electrogenic. This article summarizes the results on the electrogenic mechanism and its regulation in Characeae cells which were revealed by the intracellular perfusion study. 1) The electrogenic pump is fueled by $Mg \cdot ATP$. 2) The H^+ -efflux is dependent on ATP, evidence that the ion species carried by the pump is H^+ . 3) The electrogenic activity of the pump almost saturated at $100 \mu M$ ATP. 4) The pump is inhibited by vanadate applied internally and half inhibition concentration is about $5 \mu M$. 5) ADP inhibits the pump in the presence of ATP. 6) The pump is activated by light via photosynthesis. Activation is caused by the factor(s) other than the substrates, H^+ and ATP. 7) Anoxia inhibits the pump. However, the extent of ATP decrease caused by anoxia is not enough to account for the inhibition of the membrane potential. Some part of the inhibition is caused by increased ADP. 8) In excitation of the plasma membrane, the pump component of the membrane potential also changes together with the diffusion potential. Advantages of the intracellular perfusion for studying electrogenesis were discussed.

しんめん てるお

1948年兵庫県生。1966年愛媛大学文理学部卒。1977年大阪大学博士課程卒。関西医療検査大学校を経て現在に至る。主として車軸藻類の膜生理学に従事していますが他に細胞運動、刺激生理学にも興味を持っています。田舎でアマゴ、アユ、ウナギ等を追いかけていると我を忘れてしまい、およそ大都会で生活する型の人間ではないと思っています。立場上仕方なくつきあい酒を飲まなければならないのが悩みの種です。

電話(03) 812-2111 内線 4460

たざわ まさし

1930年横浜に生まれる。1950年に新設された阪大理学部生物学科に翌年入学。以来1977年東大理学部植物学教室に移るまで、大阪で神谷宣郎教授の研究室に居座る。植物細胞の水透過性、浸透調節、電気生理学、原形質流動の調節などの他にドイツに出かけてサーカディアンリズム、培養細胞の不定胚形成なども手がけた。京都の三高時代琵琶湖、隅田川で散々ボートを漕いだ。今はラグビーに熱中。とは云ってもテレビ観戦。酒は趣味を通り越していたが天罰が下り体をこわし、目下自粛中。

電話(03) 812-2111 内線 4457