膜透過系の再構成

曾根 専史 Nobuhito SONE
平 田 肇 Hajime HIRATA
自治医科大学学生化学教室

生体膜は細胞の数多くの生命現象を司る場として重要なばかりでなく、細胞膜として外界から内部環境を保護し、あるいは内膜系として細胞内に部分的な区画を作りだしている。これらの生体膜については、リン脂質などの極性脂質が2分子層を作って、その中に種々の膜タンパク質が単独で、あるいは複合体を作って浮かんでいるというモデル⁽¹⁾が広く一般に受け入れられるようになった。この極性脂質2分子層は膜の障壁としての役割を果たしており、生体膜は脂溶性物質は透過させうるが、水を除く水溶性物質は急速には透過させることができない。生体膜がそれを透過できる場合は、何らかの装置、すなわち膜に内在する特異的なタンパク質が存在することを期待してよい。生体膜における膜透過とは、タンパク質性の担体によって仲介される輸送に他ならないが、これは次の3つに分類できる。

- 1) 促進拡散 (facilitated diffusion)
- 2) 能動的輸送 (active transport)
- 3) 共輸送 (co-transport)

その他に、溶質が輸送に際して化学変化を受ける場合が知られている。グラム陰性細菌におけるフォスフォトランスフェラーゼ系⁽²⁾による糖のリン酸化糖への変換を伴う輸送 (group translocation) や、小腸における蔗糖の吸収が単糖への加水分解と共役していることなどがそれに当る。これらは 1)~3) の膜透過と本質において変わらないが、この解説では扱わないことにする。

1. 膜透過とは

1) 能動的輸送と受動輸送

膜透過をエネルギー論的にみると、次の Ussing の式を満足するものが受動輸送、従わないのが能動的輸送ということになる。

$$\ln (\text{Influx/Efflux}) = \ln (C_i/C_o) + \frac{ZF}{RT} \Delta\psi_{i-o}$$

(C_i , C_o は溶質の内側および外側の濃度で、 Z は溶質の電荷、 $\Delta\psi_{i-o}$ は膜電位、 F/RT は熱力学的な比例定数)

受動輸送は他の系からのエネルギーの供給を必要とせず、電気化学ポテンシャル $\Delta\mu A$ の勾配にそって downhill に起こる。受動輸送のうち担体によって輸送されるものが促進拡散ということになる。

一方、能動的輸送 (広義) は uphill に溶質が輸送される現象であり、これには2種類ある。能動輸送 (狭義) は ATP の加水分解などの化学反応によってエネルギーが供給されるもので、 Na^+ , K^+ -ATPase, H^+ -ATPase のようなイオンポンプが知られている。より広汎にみられる能動的輸送の形式は共輸送であって、たとえばアミノ酸の小腸における吸収ではアミノ酸は Na^+ とともに輸送される (symport)。この場合、 $\Delta\mu \text{Na}^+$ によってエネルギーが供給され、アミノ酸は勾配に逆らって uphill に輸送される。また、共輸送には、互いに類似した溶質が反対方向に担体によって輸送される場合 (antiport) も知られている。

2) 能動的輸送とエネルギーの供給

生体におけるエネルギー変換の問題は、化学浸透圧説 (chemiosmotic theory)⁽⁸⁾ にもとづいて近年大きな発展をとげた。実験的にも、電子伝達反応に共役する ATP 合成 (酸化的リン酸化および光リン酸化反応) において、電子伝達と ATP 合成を結ぶ高エネルギー中間体は $\Delta\mu H^+$ に他ならないことがわかった⁽⁴⁻⁶⁾。この $\Delta\mu H^+$ は膜透過におけるエネルギー源としても役立っているの、膜透過におけるエネルギー共役は図 1 のように整理できる。すなわち、電子伝達鎖によって H^+ の輸送が行なわれ、 $\Delta\mu H^+$ が形成される。これは H^+ -ATPase の逆反応によって ADP と P_i から ATP を合成するのに利用されるほか、共輸送系のエネルギー源でもある。無酸素状態とか光なしで電子伝達が行なわれないときには、逆に ATP を分解して $\Delta\mu H^+$ が形成され、能動的な膜透過が行なわれる。大腸菌その他のグラム陰性細菌では、ATP またはそれから生じる高エネルギー化合物に直接依存して、ある種の糖やアミノ酸を能動輸送する系が存在する証拠があるが、その実体はまだわかっていない^(6,7)。

このような $\Delta\mu H^+$ をエネルギー源とする共輸送系は多くの細菌、ミトコンドリアおよびクロロプラストに共通している。一方、真核生物形質膜には電子伝達鎖は存在せず、この場合は細胞質中の ATP を Na^+, K^+ -ATPase によって $\Delta\mu Na$ に転換し、 Na^+ との共輸送によって各

種の溶質の能動的な膜透過が行なわれている。この場合は、図 1 において、B を Na^+, K^+ -ATPase に、C を Na^+ と S の symporter におきかえて考えればよい。

3) 膜透過の機構

上述のような膜透過は、どのような機構によって行なわれるのであろうか。これまでに、いくつかの仮説が提出されているが、その中心は疎水の膜構造をいかに親水性溶質が通過するかという点であって、大別して次の 3 つの考え方に整理される。

- 1) チャンネル (channel) モデル
- 2) 可動担体 (mobile carrier) モデル
- 3) 回転担体 (rotating carrier) モデル

チャンネルは、膜を貫通して、もっとも単純には穴 (pore) が開くというものである。たとえば鎖状ペプチドであるグラミシジン A^{*} (1,700 ダルトン)⁽⁸⁾ は、縦に 2 分子つながれば極性脂質 2 分子層の疎水性領域を横切る H^+ と一価カチオンに特異的な穴を形成する。

可動担体のよい例はイオノファア⁽⁹⁾ と呼ばれる一群の抗生物質 (200~2,000 ダルトン) である。これらは陽イオンと脂溶性の複合体 (包接化合物) を作り、疎水性領域を熱運動によって横切ることで膜透過を行なわせる。

回転担体モデルでは、たとえば内側に Na^+ を、また外側に K^+ を結合した Na^+, K^+ -ATPase が ATP 水解に際してクルリと裏返り、膜を横切る輸送が起こるというものであるが、実際にはそのようなことは熱力学にみて起こりそうにないし、否定する実験もある⁽⁹⁾。しかし、1) や 2) の機構では狭義の能動輸送であるポンプは説明できず、分子全体の裏返りはないとしても、部分的な構造変化によるミクロな位置変化が行なわれ、それが 1) または 2) の機構によって膜内を輸送され则认为ねばならない。この場合、ミクロな位置変化とはポンプに存在する障壁である弁 (gate) を横切るかあるいは開かせるものであらねばならない。

1) や 2) の具体例として上述したものは、分子量が精精 2,000 までの抗生物質による透過機構であった。これよりはずっと分子量の大きい膜タンパク質による輸送はどうか? 好塩菌 *Halobacterium* に存在する分子量 26,000 のバクテリオロドプシンは光を用いて H^+ を輸送するポンプであるが、分子内に H^+ のチャンネルがあると思われる⁽¹⁰⁾。一方、共輸送を考える場合、可動担体モ

図 1 電子伝達鎖 (A), H^+ -ATPase (B), および膜透過系 (C, D, E) の共役

C は H^+ と溶質 1 (S_1) の symporter. D は溶質 1 と溶質 2 (S_2) の antiporter. E は H^+ と Na^+ の antiporter.

デルは都合がよい。しかし、分子量がイオノフォアよりも大きい膜タンパク質の場合、十分な速度で溶質と複合体を作って膜内を拡散するであろうか。共輸送のキャリアがこの機構によって働いているという証明はまだない。

4) 透過能の再構成

現在、膜透過が実際どのような機構によって行なわれているのかまだよくわかっていない。膜透過を司るタンパク質が精製され、その物性が調べられはじめたところである。これらのタンパク質を極性脂質とともに小胞（プロテオリポソーム）に再構成すれば、小胞膜内外に電気化学ポテンシャルを形成することもでき、さらにタンパク質が変性していなければ膜の透過能を再構成できる。したがって、再構成法⁽¹¹⁾の確立によって初めて、膜透過現象を生化学的なアプローチによって最後まで研究してゆく見通しが得られたといえる。以下、第2節ではこのような方法の概要を述べ、具体的な輸送実体の研究は、能動輸送ないしイオンポンプ（第3節）と促進拡散・共輸送ないしキャリアー（第4節）に分けて述べる。

2. 膜透過系再構成の方法

膜透過反応を人工的な系で再現するに当たっては、いくつかの問題がある。第1に膜からの可溶化、第2に精製法、第3に再構成法、第4に活性測定法、などである。

1) 可溶化、精製

第1節で述べたように、膜透過に関与するタンパク質は内在性 (intrinsic) のものが多く、膜脂質と疎水結合で結合しているので、その可溶化、精製には、多くの場合界面活性剤、有機溶媒、SCN⁻や I⁻のようなカオトロピックイオンなどを使用する。その具体的な方法については、まだ個別に試行錯誤をくりかえしつつ展開していく場合が多いが、最近になってある程度、科学的で合理的な技術の体系化が進んできている^(12,13)。

これら膜タンパク質は、界面活性剤などを除くと一般に凝集し、沈澱してしまうので、精製の各段階ではこれらを共存させなくてはならないが、再構成の際には除かなくてはならない。有機溶媒の場合は減圧下で除き、カオトロピックイオンは透析で除くことができる。イオン性の界面活性剤であるコール酸は臨界ミセル濃度が高く、

ミセルの大きさも小さいので透析で除けるが、よく用いられる非イオン性界面活性剤のトリトン X-100 は臨界ミセル濃度が低く、透析では除けない。この場合は、コール酸で平衡化したセファデックスカラムを通してコール酸におきかえたり、あるいはコール酸存在下で硫酸50%飽和させてタンパク質を沈澱させることによってトリトンを効率よく除くことができる。また、最近、Bio-beads SM-2 (Biorad 社製) で除く方法が報告されている⁽¹⁴⁾。筆者らの経験では、トリトンは除けるが、活性が失われることもある。

2) 再構成の方法

再構成の方法はいくつか考案されている。いずれも、膜構造の基本的な要素であるリン脂質2重層によって疎水性の隔壁を作り、内外の区別をつけることが必要である。そして、その中に膜透過系のタンパク質をうめこみ、放射性同位元素で標識した基質あるいはイオンの移動を測定する。大別して、支持体を利用して黒膜を作る方法と、小胞（プロテオリポソーム）を作る方法が考えられる。

黒膜は、テフロンなどの支持体にあけた小孔にリン脂質2重層を形成させることによって作製できる。これまでのところ、黒膜に透過系のタンパク質やキャリアータンパク質などを直接うめこんで実際に物質の出入りをみたという例は知られていない。膜の面積が小さいことや、リン脂質を溶かすために使う有機溶媒がタンパク質を変性させてしまうこと、あるいは安定な黒膜を得るには相当な技術を要することなどの問題点のためであろう。しかし、この方法は電気的な測定を自由に行なえるという利点があり、今後の発展が期待される。イオンポンプをまずプロテオリポソームに再構成した後に、小孔に作ったリン脂質膜（必ずしも黒膜である必要はない）に吸着させる方法も開発されている⁽¹⁵⁾。

一方、プロテオリポソーム法は、リン脂質と膜タンパク質を適当な条件下に小胞に再構成する方法であり、無数の平均が扱えるという長所がある。目的や透過系タンパク質の性質に応じて、いくつかの方法が考案されている。

① 音波処理法⁽¹⁶⁾

もっとも簡便な方法で、乾燥したリン脂質を適当な溶媒に懸濁し、透過系タンパク質を加えて音波処理を行な

図 2 好熱菌の H^+ -ATPase($TF_0 \cdot F_1$) (A) とそれから再構成したプロテオリポソーム (B) の負染色像
(A) $\times 200,000$, (B) $\times 160,000$

う。この方法は、音波破碎機の性質から、やや再現性に乏しいことが欠点である。

② コール酸透析法⁽¹²⁾

リン脂質をコール酸（通常 2%；デオキシコール酸を併用する場合もある）に溶かし、目的とするタンパク質とともに、適当な溶媒に対して透析（通常 10～17 時間）することによってプロテオリポソームを得る。最近では、もっとも広く用いられているし、成功例も多い。図 2 に、この方法で作製した好熱菌より得た H^+ -ATPase を含むプロテオリポソームの電顕写真を示す。

③ コール酸稀釈法⁽¹⁷⁾

コール酸透析法と同様に、コール酸に溶かしたリン脂質とタンパク質の混液（なるべく少量）を適当な溶媒で 20～50 倍に稀釈する。この方法は、簡便で再現性も良いが、プロテオリポソームを大量に必要とする場合には適していない。

④ 凍結融解法⁽¹⁴⁾

リポソームを音波処理法で作製したのち、界面活性剤を除いたタンパク質と混ぜ、ドライアイス-アセトンで急速に凍結する。その後、室温で融解し、短時間（20～30 秒）の音波処理を行なう。この方法は、ミリポアフィルターにも十分ひっかかる大きい小胞を作りうる特徴がある。

⑤ 挿入法⁽¹⁸⁾

やはりリポソームを先に作っておき、リゾレシチンの存在下で膜タンパク質を加える。後から加えるので膜タンパク質の親水面が外側を向き、内外性が規定しやすい。

3) 活性測定法

Na^+ , K^+ -ATPase, H^+ -ATPase のようなイオンポンプの場合とはちがく、糖やアミノ酸などのキャリアータンパク質は、一般に他の酵素活性をもっていないので、つねにその活性を測定する方法が問題となる。一般には、前項のようにして再構成した系を用いて、放射性同位元素で標識した基質の移動を測定すればよいが、共輸送系の場合はエネルギーの供給が必要であるので、さらに複雑になる。

① 促進拡散の測定

目的とするタンパク質をプロテオリポソームに再構成し、放射性の基質のとりこみをミリポアフィルターなどを使って測定する。この際に問題となるのは、ミリポアフィルターの孔径、リポソームからのもれ出しなどであるが、これらは、試行錯誤をくりかえして最良の条件をみつけないてはならない。さらに、この場合には、対照としてキャリアータンパク質を欠いたリポソームや、基質特異性、特異的阻害剤などの影響をみる必要がある。

② 能動的輸送の測定

前述のイオンポンプの場合、エネルギー源として ATP を与えればよいが、共輸送の場合には、 $\Delta\mu\text{H}^+$ あるいは $\Delta\mu\text{Na}^+$ などの形でエネルギーを供給する必要がある。これらは、生体ではそれぞれのポンプがその役割を果たしているが、ここではそのようなポンプから切りはなして測定せねばならないので、人工的な $\Delta\mu\text{H}^+$ や $\Delta\mu\text{Na}^+$ を小胞内外に与えることが必要になる。

その1つの方法として、 K^+ の拡散電位を利用する方法がある。すなわち、再構成プロテオリポソームに K^+ 塩（陰イオンとしては、 Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} など膜不透過性のものを用いる）を負荷しておき、バリノマイシンなど、 K^+ に特異的なイオノフォアを与えることによって得られる K^+ の拡散電位（小胞内が負）を利用する。モデルを図3に示す。逆に、 K^+ 塩を外側にのみ存在させれば、バリノマイシンによって小胞内が正になる。

また、チオシアンイオン (SCN^-) は膜透過性が高いので、その K^+ 塩や Na^+ 塩を小胞の外側に与えると SCN^- のみが移動し、内側が負の電位差が形成される。

このようにして人工的な電位差をプロテオリポソームに与えることによって、能動的輸送ばかりでなく、イオ

図3 K^+ を負荷した膜小胞にバリノマイシンを与えることによって生じる膜電位差と、基質の H^+ と共役した能動的輸送

ン輸送性 ATPase (イオンポンプ)の逆行によって ATP 合成を駆動させることもできる。

3. イオンポンプ

1) カチオンポンプの分布と機能

これまで、その実体が判明したイオンポンプは表1のようなものである。 Cl^- , HCO_3^- のようなアニオンを輸送するポンプの存在が仮定されることもあるが、その実体はわかっていない。

H^+ -ATPase は分布が広く、細菌から高等動物に至るすべての生物に存在する。ただし、原核生物では細胞膜に、真核生物ではミトコンドリアおよびクロロプラスト膜に存在する。好気性または光合成生物では $\Delta\mu\text{H}^+$ を利用しての ATP 合成、光合成をしない嫌気性生物では発酵によって作られた ATP を利用して逆に $\Delta\mu\text{H}^+$ を生じ、各種溶質の膜透過に必要なエネルギーを供給していることはすでに述べた。

Na^+ , K^+ -ATPase は動物細胞膜に存在し、 $\Delta\mu\text{Na}^+$ および $\Delta\mu\text{K}^+$ を作り出している。種々の細胞膜における Na^+ , K^+ -ATPase の活性の強さとカチオンの輸送量とは良い相関のあることが知られており、電気ウナギ発電器官、サメ直腸腺などは活性が強く、格好の材料として用いられている。

Ca^{2+} -ATPase は筋小胞体に高濃度存在しており、筋繊維中より Ca^{2+} をとり去って小胞体に貯めておき、神経興奮に際して放出する機能を果たしている。

胃粘膜旁細胞の H^+ , K^+ -ATPase は胃酸分泌に役立っており、 H^+ を細胞より放出し、 K^+ をとりこむ。胃酸の pH は1以下になるので、細胞内外の ΔpH は6にも及ぶ。

これらの動物細胞膜ないしは小胞体膜に存在する ATPase は、いずれも分子量約 100,000 のサブユニットが主成分で、単純な構成をもっている。一方、 H^+ -ATPase

表1 カチオン輸送活性をもつ ATPase

名 称	材 料	カチオン/ATP	分子量	サブユニット構成	サブユニット分子量(キロダルトン)	文 献
H^+ -ATPase	好熱性細菌 PS3	2H^+	500,000	$\text{F}_1(\alpha\beta\gamma\delta\epsilon)$ $\text{F}_0(\zeta\eta)$ または $(\zeta\eta\theta)$	表2参照	4, 5, 19, 20
Na^+ , K^+ -ATPase	サメ直腸腺	$3\text{Na}^+/2\text{K}^+$	250,000	$\alpha_2\beta$	α 970 β 55	21, 22
Ca^{2+} -ATPase	筋小胞体	$2\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	400,000	$\alpha_4(\chi)$	α 100 χ 12	23, 24
H^+ , K^+ -ATPase	胃粘膜	H^+/K^+	—	α_n	α 100	25

表 2 H^+ -ATPase のサブユニット

PS 3				酵 母			ウ シ 心 筋		
番号	分子量	数	名 称	番号	分子量	名 称	番号	分子量	名 称
1	56,000	3	$TF_1 \alpha$	1	58,000	$F_1 \alpha$	0	73,000	混入物
2	53,000	3	$TF_1 \beta$	2	54,000	$F_1 \beta$	1	55,000	$F_1 \alpha$
3	32,000	1	$TF_1 \gamma$	3	38,000	$F_1 \gamma$	2	52,000	$F_1 \beta$
4	19,000	0~1		4	31,000	$F_1 \delta$	3	30,000	$F_1 \gamma$
5	15,500	1	$TF_1 \delta$	5	29,000	膜性因子	4	29,000	
6	13,500	2~3	TF_0, TF_1 結合性	6	21,000	膜性因子	5	20,000	
7	11,000	1	$TF_1 \epsilon$	7	18,500	OSCP	6	19,000	OSCP
8	6,000	5~6	$TF_0, DCCD$ 結合性	8	12,000	$F_1 \epsilon$ (インヒビター)	7	12,500	$F_1 \delta$
				8'	12,000	膜性因子	8	10,000	膜性因子 (DCCD結合性)
				9	7,800	膜性因子(DCCD 結合性)	9	8,000	$F_1 \epsilon$ (インヒビター)

は複雑なサブユニット構成をもっており、存在部位も細菌細胞膜か細胞内小器官となっている。

2) H^+ -ATPase

H^+ -ATPase は、酸化的リン酸化反応や光リン酸化反応、すなわち電子伝達反応に共役する ATP 合成反応において、共役因子としてまず追究された⁽⁴⁾。たとえば、亜ミトコンドリア粒子（ミトコンドリア内膜の小胞化した破片）を低イオン強度下で 1mM EDTA 中におき遠心して得た粒子は電子伝達を行なうが、リン酸化反応は失われる。この上清には共役因子 F_1 が含まれており、同時に ATPase 活性をもつ。その後、ミトコンドリア内膜表面に存在する 85Å 粒子そのものであることがわかった。 F_1 のもつ ATPase 活性は、しかし i) 活性の発現にリン脂質を要求せず、ii) オリゴマイシン、DCCD などのエネルギー転移阻害剤非感受性であるほか、iii) 低温で失活するので、内膜のもつ ATPase 活性とは性質を異にしている。これは、膜内に、 F_1 と結合して新しく膜 ATPase としての性質を与える成分が存在するためで、これを F_0 と名付けた。すなわち、膜 ATPase は $F_0 \cdot F_1$ 複合体であって、 F_1 はその表在性成分ということになる。 $F_0 \cdot F_1$ は化学浸透圧説によれば H^+ -ATPase でなければならないが、これはその後の研究で証明された。

以上に述べた研究は、主としてウシ心筋ミトコンドリアを用いて行なわれ、 F_1 もこれを材料に精製されている。しかし、この $F_0 \cdot F_1$ 複合体は不安定であり、単離することが困難であった。一方、好熱性細菌細胞膜を材料にして、最近、 $TF_0 \cdot F_1$ (thermophilic $F_0 \cdot F_1$) が精製され、 H^+ -ATPase としての性質とその構造との相関が明らかにされつつある。

① H^+ -ATPase の精製とサブユニット構成^(19,26)

好熱性細菌 PS 3 の膜をトリトン X-100 で可溶化し、その存在下で DEAE-セルロースおよびセファロースカラムによって ATPase ($TF_0 \cdot F_1$) を精製する。これは、表 2 に示したような 7~8 種類のサブユニットよりなるが、そのうち $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ の 5 つのサブユニットは表在性成分 TF_1 の構成成分である。この TF_1 -ATPase は、別の方法で精製されている。 $TF_0 \cdot F_1$ を尿素処理すると TF_1 は解離し、膜内在性部分 TF_0 を沈澱として得ることができる。これは 2~3 個のサブユニットよりなる。 $TF_0 \cdot F_1$ の ATPase 活性は、リン脂質要求性でエネルギー転移阻害剤 DCCD 感受性である⁽²⁶⁾。 H^+ 輸送は $TF_0 \cdot F_1$ を単にリン脂質と混ぜたのみでは出現せず、次のように透析法により再構成した小胞で発現できる。

② 再構成小胞での H^+ ポンプ活性^(5,27)

再構成小胞に ATP を加えると、 H^+ を電位発生的に外から内へ輸送し、 $\Delta\psi$ と ΔpH を生じる。ATP を 1 mM 加え、その 1/4 が ADP と P_i に変わった時点で測定された $\Delta\psi$ は 113mV (内部正)、 ΔpH は -3.1 ユニット (内部酸性) となるので、 $\Delta\mu H^+ = \Delta\psi - Z\Delta pH$ は約 300mV となる。一方、この条件 (pH8, 45°C) での ATP の加水分解の自由エネルギー変化 ΔG は -14kcal/モルとなるので、ATP 1 個の分解当り 2 個の H^+ が動くことすれば 304 mV となり、測定値とよく一致する。ただし、 $2H^+/1ATP$ という化学量論的關係は、ミトコンドリアでは測定されているが、クロロプラストではむしろ $3H^+/1ATP$ であるという。精製 H^+ -ATPase を再構成した系では、 H^+ 輸送と共役しなくなった変性標品の存在のためにやや低い値がでる。

再構成小胞をあらかじめ酸性の緩衝液で平衡してお

図4 TF_0 小胞における H^+ 透過(D)とその TF_1 添加(C)または DCCD 添加(B) による阻害
Aは TF_0 を含まないリボソームの場合で、 H^+ 透過能はない。内側に KCl を負荷した小胞にバリノマイシンを加え、pH メーターで反応を追う。

き、ついで外側をアルカリ性になると、小胞膜内外に ΔpH を作り出せる (Jagendorf による酸-塩基 ATP 合成)。外側の液に KCl を含ませておいてバリノマイシンを加えると、拡散電位による $\Delta\psi$ をも作り出せる。 $\Delta\psi$ を 200mV 以上にし、 P_i と ADP を加えると、有意の ATP 合成が 10~20 秒間みられる。最適条件 ($pH_o=8.3$, $pH_i=5.5$, $[KCl]_o=0.15$) では約 100 n mol/mg $TF_0 \cdot F_1$ の ATP 合成があるので、 $TF_0 \cdot F_1$ 分子の分子量 500,000 として 50 回程度回転していることになる。

これらの実験事実は、 $TF_0 \cdot F_1$ が可逆的な H^+ -ポンプそのものであることを示している。

③ TF_0 の H^+ チャンネルとしての役割⁽²⁸⁾

H^+ -ATPase の膜内成分 F_0 はどのような役割を果たしているのだろうか。 F_0 は F_1 のもつ ATPase 活性に対してリビド要求性とエネルギー転移阻害剤感受性を与えるが、独自の機能としては H^+ の膜内通過路となっている。リボソームは H^+ を通さないの、KCl 濃度勾配とバリノマイシンで $\Delta\psi$ を発生させて $\Delta\psi$ を与えても H^+ の輸送は起こらない。しかし、 TF_0 を組みこんだ小胞を用いると H^+ の輸送が起こり、図4のように外液の pH が上がり、内部の pH は下がる。この H^+ 輸送は、 TF_1 あるいはエネルギー転移阻害剤 DCCD で止めることができる。

すでに述べたように、 TF_0 には分子量が 19,000, 13,500 および 6,000 のポリペプチドが含まれる。13,500 ダルトン成分は TF_1 を結合する役割がある。最小の

図5 $TF_0 \cdot F_1$ のモデル
そのサブユニット構造とポンプ(pump), 弁(gate), 通路(channel) 部位を示している。

6,000 ダルトン成分は有機溶媒で抽出可能なプロテオリピドであって、DCCD はこの成分に結合する。この成分がどのような機構で H^+ を通しているか、イオノフォアとして H^+ を運ぶのか、あるいは H^+ に特異的な穴を形成するのか、また TF_1 結合サブユニットとどのように TF_0 を構成するのかは、よくわかっていない。19,000 ダルトン成分は、これを欠いても TF_0 の機能に見かけ上障害はなく、混入かもしれない。

④ TF_1 各サブユニットの役割⁽²⁹⁾

TF_1 を尿素中で解離させ、イオン交換セルロースで分離することにより、 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ の各サブユニットを単離できる。単なる ATPase 活性の再現には $\alpha\beta\gamma$ または $\beta\gamma$ を混じ、尿素を除くだけでよい。 α と β は分子量の点でもアミノ酸組成の点でもよく似ているが、 α には変性すると現われる SH 基があり、 α または β にヌクレオチド結合部位が存在する。 TF_0 小胞の H^+ 輸送能の阻止(図4参照)には、 $\gamma\delta\epsilon$ を同時に加えるか、 $\delta\epsilon$ の後から γ を加える必要がある。また、エネルギー変換能という H^+ -ATPase 全体の機能発現には、 TF_0 小胞に $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ すべてのサブユニットが必要である。

⑤ H^+ -ATPase のモデルと反応機構

図5に H^+ -ATPase のモデルを示す。 $\alpha\beta$ が活性中心であって、 $ATP \leftrightarrow ADP + P_i$ の変換が行なわれ、それに共役して H^+ を送り出すポンプの役割を果たしている。 γ は弁 (gate) であって、 H^+ はここを通過してゆく。 $\delta\epsilon$ は TF_0 との結合の役割をもつ。膜部分 TF_0 は H^+ の通路 (channel) であり、 TF_0 の 13,500 ダルトン

図 6 $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ (左)および $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ (右)の反応経路
矢印は ATP 分解方向のみ記してあるが、完全に可逆的な反応である。
ATP の分解を行なう触媒部位は細胞質側にあり、輸送されるべきカチオンは膜の反対側へ通過してゆくことに注目。

成分はトリマー構造を作って TF_1 を結合するため膜の表面に存在するものと考えられる。6,000 ダルトン成分は H^+ の膜内移動にプロテオリビドとして重要な役割を果たしているのであろう。逆に、ADP と P_i が存在する場合は、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が小さいときは γ は閉じているが、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が十分大きければ弁が開き、 $\alpha\beta$ 部分で ATP が作られる。反応に際してこれらのサブユニットにどのように構造変化が起こるかについては、まだここに述べるほどのまとまった知見は得られていない。リン酸化中間体はこれまでのところ発見されていない。

3) $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ および $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ ^(22,24)

これらのポンプの ATPase 活性は、 $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ の場合は Na^+, K^+ で、 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ の場合は $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ で顕著に活性化を受けることが知られている。また、ATP の分解に際して、リン酸化中間体 (EP) が生じることが知られている。反応を熱力学的および動力学的に解析することにより、図 6 のような連続する素過程によって輸送が行なわれていることが認められる。また、図 6 は H^+-ATPase の場合と同じく、いずれも細胞質の側で ATP がイオンの動きと共役して水解されるとして示されている。細胞内側を向いた結合部位に Na^+ が、細胞外側にある部位に K^+ が結合し、ATP の水解エネルギーで $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ がクルリと回転して輸送され

るといった回転担体モデルは、表面の親水性基がリン脂質 2 分子層の疎水性の層を通り抜けるのが困難だという熱力学的な理由で、起こりそうにない。むしろ、図のようにカチオンに特異的な通路またはイオノフォアによって細胞外側または小胞体内へ運ばれるものであろう。

一方、表 1 にまとめたように、 $\text{Na}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ の分子量は 25 万、 $\alpha^2(\beta)$ のサブユニット構成をもつものが精製されている⁽²¹⁾。アブラザメ直腸腺から精製されたものは、リン脂質と小胞に再構成すると ATP 水解に共役して Na^+ を外から内に、 K^+ を内から外に輸送することが認められた⁽³⁰⁾。 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ は筋小

胞体自体の 70% を占めるタンパク質で、やはりそのサブユニットは 98,000 ダルトンの成分のみからなる。単量体 $\leftrightarrow$ 4 量体の変換があり、後者が活性であるとの報告もある⁽²³⁾。このタンパク質もリン脂質とともに小胞に再構成すれば、ATP 水解に共役する Ca^{2+} の外から内への輸送が行なわれる⁽³¹⁾。 $\text{H}^+, \text{K}^+-\text{ATPase}$ も小胞への再構成に成功した⁽³²⁾。これらの精製 ATPase が再構成可能であり、イオンポンプとして働くことが確かめられたことは、酵素としての反応解析からタンパク質としての構造解析への道が開かれたことを示している。

4. キャリアーの単離と再構成

細胞が外界から糖やアミノ酸あるいはヌクレオチド塩基などの栄養分をとりこむことは広く知られている。この基質輸送を仲介する物質、すなわちキャリアー (carrier) の正体が生体膜にくみこまれた特異的なタンパク質であることが示唆されたのは 1950 年代であり、その後、実体として確認されたのは大腸菌におけるラクトースの輸送系であり、ラクトースオペロンの y 遺伝子の生産物がそれであった⁽³³⁾。その後、これらの基質輸送系を膜から単離する試みが多くなされたが、ごく最近になるまで成功しなかった。その主な原因としては、①再構成の方法論があまりにも進んでいなかったために、活性測定が困難であったこと、②エネルギー共役が必要な能動

的輸送系では、エネルギーを供給する手段が開発されていないこと、③可溶化、精製に必要な手段の情報が不足していたこと、特に疎水性タンパク質の取り扱いについての情報が少なかったことなどがあげられよう。そして、基質の膜透過系の可溶化と再構成についての報告が出てくるようになったのは、この2～3年である。

1) 高等動物における糖およびアミノ酸輸送系

すでに述べたように、糖やアミノ酸輸送系には細胞内外の濃度差に従うもの（促進拡散）と、逆らうもの（能動的輸送）とがある。前者には、赤血球におけるグルコース、中性アミノ酸の輸送、あるいは脂肪細胞におけるグルコース輸送などが、後者には、 Na^+ との共輸送で行なわれる小腸上皮細胞や腎尿細管におけるグルコース、アミノ酸輸送などがある。これらのキャリアーの精製には、次のような方法がある。

- 1) 界面活性剤による可溶化、精製法
- 2) ネガティブ精製法

1) に属するものとして、Kasahara と Hinkle⁽¹⁴⁾ らのヒト赤血球からの D-グルコース輸送系、Crane ら⁽³⁴⁾ の刷子縁膜からのグルコース輸送系の可溶化、精製、再構成があげられる。これらは、いずれもトリトン X-100 を用いて可溶化し、Bio-beads SM-2（前述）でトリトン X-100 を除き、そのうち大豆リン脂質で再構成するものである。

2) に属するものでは、細胞膜を化学薬品やタンパク分解酵素で処理し、表在性 (extrinsic) のタンパク質を除きながら、輸送系のみを膜に残しながら精製を進めていく方法があり、Semenza ら⁽³⁵⁾ の小腸刷子縁膜の D-グルコース輸送系、Shanahan ら⁽³⁶⁾ の脂肪細胞膜の D-グルコース輸送系についての報告がある。

ヒト赤血球あるいは脂肪細胞の D-グルコース輸送系はいずれも糖を含むタンパク質であり、分子量はそれぞれ 55,000 と 94,000 と推定されている。これらは、いずれも基質特異性が高く、再構成リポソームでは、D-グルコースのみが促進輸送され、

L-グルコースではみられない。また、この再構成系による D-グルコース輸送は、サイトカラシン B で阻害される。しかし、同様に、生細胞でのこの系の特異的阻害剤といわれているフロレチン (phloretin) の効果については、Kasahara ら⁽¹⁴⁾ の報告と Shanahan ら⁽³⁶⁾ の報告とで異なり、前者の系では阻害が起こらない。このことは、フロレチンの阻害機構は輸送系に直接作用するものでなく、別の要素が関与することを示唆する。また、Kasahara らの報告では、この D-グルコース輸送系は赤血球膜を貫通しているらしく、この輸送系が糖を含んでいることと併せて考えると、可動性のキャリアータンパク質というよりもチャンネルを考えたほうが自然である。

小腸や腎臓の刷子縁膜における D-グルコースやアミノ酸の能動輸送が Na^+ イオンとの共輸送で行なわれることは古くから知られているが⁽³⁷⁾、これに対して Crane⁽³⁸⁾ は、糖-Na-担体三重複合体説 (ternary complex theory) を提出している。これは、 Na^+ が電気化学的ポテンシャル差（内側が負）に従って移動する力を利用して糖が輸送されるというもので、担体に糖と Na^+ が直接結合することを仮定している。この説を間接的に支持する報告は多いが、直接的に三重複合体を証明するには至っていない。Crane ら⁽³⁴⁾ や Semenza ら⁽³⁵⁾ の報告では、D-グルコース輸送系の可溶化とプロテオリポソームへの再構成および Na^+ 依存性の D-グルコース輸送をみているが、まだ精製が不完全なため、はたして糖-Na-担体三重複

図 7 大腸内細胞膜におけるラクトース輸送とエネルギー共役
(文献 41 より改変)

C : 低親和性で潜在的な状態のラクトースキャリアー
 *C : 高親和性で受け入れ体勢のラクトースキャリアー
 C⁻ : プロトン化されていないラクトースキャリアー
 CH : プロトン化されたラクトースキャリアー
 LAC : ラクトース

合体が形成されるのか否かの解明は将来に残されている。

2) 細菌における糖およびアミノ酸輸送

細菌細胞における糖やアミノ酸の能動的輸送とエネルギー共役については、主に大腸菌から単離された細胞膜を用いて Kaback らが系統的な追究を行なっている^(39,40)。その大要を示すと、次のようである。すなわち、単離された細胞膜小胞は、D-乳酸などを呼吸基質として与えることにより、ラクトースや各種アミノ酸を能動的にとりこむ。これらの能動的輸送は、呼吸によって形成される $\Delta\mu\text{H}^+$ (前述) によって駆動される。この $\Delta\mu\text{H}^+$ は、基質の種類、pH など異なるが、約 100~190mV (小胞内部が負) の範囲である。輸送系と $\Delta\mu\text{H}^+$ との共役は、 H^+ との共輸送として行なわれるが (第1節)、Kaback らは蛍光性色素を結合させたガラクトシド誘導体を用いた実験から、エネルギー共役は基質がキャリアタンパク質に結合するとき起こるものであると推論している^(40,41)。すなわち、キャリアタンパク質自体が負の荷電をもち、 $\Delta\mu\text{H}^+$ が形成されると、より正に荷電した外側へ移動し、ラクトースと H^+ を結合する。そのうち、膜内を横切って内側で H^+ とラクトースを順次離す、というものである (図7)。このモデルには、いくつかの仮定が含まれている。第1に、キャリアタンパク質 (C^-) が負の荷電をもっていること、第2に、 H^+ -基質-キャリアタンパク質の三重複合体が形成されること、第3に、この三重複合体が膜内を単純拡散で移動すること、などである。図7のモデルは、現在までに知られた実験事実を説明するのには都合が良いが、これらの仮定が証明されることが必要である。そのためにも、膜からのキャリアタンパク質の単離が必要となるわけであるが、その具体的な成功例はあまり多くない。以下に、筆者らの研究室で行なわれた好熱性細菌細胞膜からアラニン輸送のキャリアタンパク質の可溶化、部分的精製と機能的膜小胞の再構成についての例を示す。

好熱性細菌 PS3 から単離した細胞膜は、NADH やアスコルビン酸-フェナジメトサルフェートを呼吸基質としてアラニンを能動的にとりこむ⁽⁴²⁾。また、大腸菌細胞膜小胞でも示されたこと⁽⁴³⁾であるが、第2節で述べたような、バリノマイシン+ K^+ の系による人工的な膜電位差によってもアラニンの能動的輸送は行なわれる。

PS3 から単離した細胞膜をコール酸とデオキシコール

酸で処理することによって、アラニンキャリアー活性が可溶化する。その後、トリトンX-100またはトリトンX-100と尿素の存在下で、DEAE-とCM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なうことによって20倍以上に精製された^(17,44)。このタンパク質はDEAE-セルロースには吸着せず、CM-セルロースにも非常に弱くしか結合されないで、電氣的に中性もしくはわずかに塩基性側に等電点をもったタンパク質であろう。また、最終標品は、SDSゲル電気泳動で、分子量約36,000と9,400の2本のバンドがみられるが、現在までのところ、これらがキャリアタンパク質のサブユニットなのか、不純物なのかは不明である⁽¹⁷⁾。

このアラニンキャリアーを含むプロテオリボソームの機能的な再構成のためには、リン脂質の特異性があり、ホスファチジルエタノールアミンかホスファチジルグリセロールが必要である。また、エネルギー源としてはバリノマイシン+ K^+ による人工的膜電位差で測定できるが、ミトコンドリアのチトクロームcオキシダーゼをアラニンキャリアーとともに膜小胞に再構成し、チトクロームc関与のもとにアスコルビン酸の酸化を行なわせることによっても駆動できる。このように、由来のまったく異なったエネルギー源でも共通に能動的輸送が駆動されることは、そのエネルギー源との関係がまったく間接的なものであることを示す。

Kusaka ら⁽⁴⁵⁾は、*Bacillus subtilis* において、脂質合成を停止させたときに細胞内に蓄積される疎水性のタンパク性顆粒 (H-protein) から、アラニンの能動的輸送を仲介するキャリアタンパク質を単離している。これは、H-protein を尿素処理し、ゲル電気泳動で分画することによって得られ、分子量7,500ダルトンのペプチドで、SDSゲル電気泳動で単一のバンドを示す。このタンパク質が膜にあるものと同一であるとするならば、細菌の基質輸送のキャリアタンパク質として最初に純化されたものとなる。

*

以上みてきたように、膜透過系の研究は、膜からの可溶化、精製、さらに機能的膜小胞の再構成といった一連の技術の進歩によって、より物質レベルでの生化学的アプローチが可能になってきた。そして、これまで black box とされていたスカラー量としての化学反応からベクトル量としての膜透過現象への転換の実体も明らかにな

りつつある。しかし、全体としては、まだ未開拓で、未知の部分が多く、これからの発展に期待しなければならぬといえよう。

文 献

- 1) S. J. Singer & G. L. Nicholson : *Science*, 175, 720 (1972).
- 2) P. W. Postoma & S. Roseman : *Biochim. Biophys. Acta*, 457, 213 (1976).
- 3) P. Mitchell : *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 14 (1976).
- 4) 香川靖雄, 曾根孝史, 平田 肇, 吉田賢右: 蛋白質 核酸 酵素, 20, 318 (1975).
- 5) N. Sone, M. Yoshida, H. Hirata & Y. Kagawa : *J. Biol. Chem.*, 252, 2956 (1977).
- 6) F. M. Harold : *Curr. Topics Bioenerg.*, 7, 84 (1977).
- 7) 天沼 宏, 小林 弘, 安楽泰宏: 生化学実験講座, 14, 307 (1977).
- 8) 平田 肇: 生体の科学, 29, 55 (1978).
- 9) A. F. Knowles & E. Racker : *J. Biol. Chem.*, 246, 2672 (1975).
- 10) E. Racker & P. C. Hinkle : *J. Membr. Biol.*, 17, 181 (1974).
- 11) T. Kagawa : *Biochim. Biophys. Acta*, 265, 297 (1972).
- 12) Y. Kagawa : *Methods in Membrane Biology*, Vol. 1, 201 (1974).
- 13) 香川靖雄, 曾根孝史, 吉田賢右: “生体膜実験法” 上, 別冊蛋白質 核酸 酵素, p. 57 (1974).
- 14) M. Kasahara & P. C. Hinkle : *J. Biol. Chem.*, 252, 7384 (1977).
- 15) L. A. Drachev, A. A. Jasaitis, A. D. Kaulen, A. A. Kondrashin, E. A. Liberman, I. B. Nemecek, S. A. Ostroumov, A. Yu. Semenov & V. P. Skulachev : *Nature*, 249, 321 (1974).
- 16) 花井哲也: “生体膜実験法” 下, 別冊蛋白質 核酸 酵素, p. 199 (1977).
- 17) H. Hirata, N. Sone, M. Yoshida & Y. Kagawa : *J. Supramol. Struct.*, 6, 77 (1977).
- 18) G. D. Eytan, M. J. Matheson & E. Racker : *J. Biol. Chem.*, 251, 6831 (1976).
- 19) N. Sone, M. Yoshida, H. Hirata & Y. Kagawa : *J. Biol. Chem.*, 250, 7917 (1975).
- 20) I. A. Kozlov & V. P. Skulachev : *Biochim. Biophys. Acta*, 463, 29 (1977).
- 21) L. E. Hokin, J. L. Dahl, J. D. Deupnee, J. F. Dixon, J. F. Hackney & J. F. Perdue : *J. Biol. Chem.*, 249, 2593 (1973).
- 22) 中尾 真: 蛋白質 核酸 酵素, 20, 366 (1975).
- 23) A. Martonosi, H. Nakamura, R. L. Jilka & J. H. Vanderkooi : “Biochemistry of Membrane Transport”, ed. by G. Semenza and E. Carafoli, Springer-Verlag, 1977, p. 401.
- 24) 金沢 徹: 蛋白質 核酸 酵素, 20, 386 (1975).
- 25) S. Sachs, H. Hung, E. Ranbon, R. Schackman, M. Lewin & G. Saccomani : *J. Biol. Chem.*, 251, 7690 (1976).
- 26) M. Yoshida, N. Sone, H. Hirata & Y. Kagawa : *J. Biol. Chem.*, 250, 7910 (1975).
- 27) N. Sone, M. Yoshida, H. Hirata, H. Okamoto & Y. Kagawa : *J. Membr. Biol.*, 30, 121 (1976).
- 28) H. Okamoto, N. Sone, H. Hirata, M. Yoshida & Y. Kagawa : *J. Biol. Chem.*, 252, 6125 (1977).
- 29) M. Yoshida, H. Okamoto, N. Sone, H. Hirata & Y. Kagawa : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 936 (1977).
- 30) S. Hilden, H. M. Rhee & L. E. Hokin : *J. Biol. Chem.*, 249, 7432 (1974).
- 31) G. B. Warren, A. P. Toon, N. J. M. Birdsall, A. G. Lee & J. C. Metcalfe : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 622 (1974).
- 32) M. C. Goodall & G. Sachs : *J. Membr. Biol.*, 35, 285 (1977).
- 33) C. F. Fox & E. P. Kennedy : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 54, 891 (1965).
- 34) R. K. Crane, P. Malath & H. Preiser : in “Biochemistry of Membrane Transport”, ed. by G. Semenza and E. Carafoli, Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 261.
- 35) G. Semenza, C. Tannenbaum, M. Kessler, G. Togenburger & L. Wahlgren : in “Biochemistry of Membrane Transport”, ed. by G. Semenza and E. Carafoli, Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 269.
- 36) M. F. Shanahan & M. P. Czech : *J. Biol. Chem.*, 252, 8341 (1977).
- 37) 星 猛, 小松行雄: “能動輸送”, 井上 章, 品川嘉也編, 南江堂, 1969, p. 53.
- 38) R. K. Crane : *Fed. Proc.*, 24, 1000 (1965).
- 39) H. R. Kaback : *Science*, 186, 882 (1974).
- 40) H. R. Kaback : in “Biochemistry of Membrane Transport”, ed. by G. Semenza and E. Carafoli, Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 598.
- 41) S. Schuldiner & H. R. Kaback : *Biochim. Biophys. Acta*, 472, 399 (1977).
- 42) H. Hirata, N. Sone, M. Yoshida & Y. Kagawa : *J. Biochem.*, 79, 1157 (1976).
- 43) H. Hirata, K. Altendorf & F. M. Harold : *J. Biol. Chem.*, 249, 2939 (1974).
- 44) H. Hirata, N. Sone, M. Yoshida & Y. Kagawa : in “Biochemistry of Membrane Transport”, ed. by G. Semenza and E. Carafoli, Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 626.
- 45) I. Kusaka & K. Kanai : *Europ. J. Biochem.*, 83, 307 (1978).

お知らせ

第 13 回天然物化学談話会 予告

と き: 昭和53年 7 月22日(土)夕~25日(火)朝
と こ ろ: 蔵王ハイツ 宮城県蔵王町遠刈田
主 催: 日本化学会, 日本薬学会, 日本農芸化学会, 各東北支部
話題提供者(順不同): ^{13}C NMR 分光法の天然物化学における応用・通和夫/なす科植物におけるフィトアレキシンについての最近の知見・正宗 直/分枝糖合成の化学・吉村寿次/天然物の全合成・亀谷哲治/クロマチンにおける遺伝情報発現の調節機構・志村憲助/酵素モデルによる生理活性天然物の合成・田伏岩夫/カルベノイドを用いる高選択的合成反応・野崎一/研究回想・松井正直

参加人員: 約 110名

会 費: 21,000円

参加申込締切: 昭和53年 6 月22日(木)必着, 申込は往復葉書を使用し, 所属, 連絡先住所(電話番号), 氏名を明記して下さい。

参加申込先: 仙台市平戸 2 丁目 1-1 (〒 980)

東北大学非水溶液化学研究所 吉越 昭
TEL (0222) 27-6200 内線 3449