Tetraphenylphosphonium (TPP⁺)によるシナプト ソームの膜電位の測定

松永 雅美* 相内 敏弘** 中谷 一泰**
高橋 剛男* 中村 泰治**

* 昭和大学教養部生物学教室; ** 薬学部生物化学教室 〒142 東京都品川区旗の台 1-5-8

Measurement of Membrane Potential in Synaptosomes with Tetraphenylphosphonium (TPP⁺)

Masami MATSUNAGA*, Toshihiro AIUCHI**, Kazuyasu NAKAYA**,
Takeo TAKAHASHI* and Yasuharu NAKAMURA**

* Laboratory of Biology, College of Arts & Sciences, and ** Laboratory of Biological
Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Hatanodai,
Shinagawaku, Tokyo 142

(Received Jan. 25, 1985)

The concentration of tetraphenylphosphonium (TPP⁺) was measured under various controlled conditions with a TPP-selective electrode. Assuming that membrane potential in synaptosomes is depolarized replacement of sodium with potassium in the physiological saline, we estimated the amount of TPP bound to plasma membranes and mitochondria in synaptosomes. About 50% of TPP⁺ was bound to plasma membranes and about 45% was mitochondria in synaptosomes. Membrane potentials in synaptosomes under various conditions were calculated by the Nernst equation using these values. The resting potential of synaptosomes was estimated to be -70 to -90 mV.

The propriety of these values obtained and of the method for calculation were discussed.

Key words: Synaptosomes, Membrane potential, Tetraphenylphosphonium (TPP⁺).

1. 緒 言

神経系の細胞では、膜電位が神経伝達や伝達物質の再
取り込みなどに重要な役割を果たしている¹⁻³⁾。通常の中
枢系の細胞は小さく、直接微小電極による膜電位の測定は
困難なので、膜電位測定プローブとして、蛍光色素^{4,5)}
や、K⁺イオン (またはRb⁺イオン)⁶⁾ や、脂溶性イオン<sup>7,
8)</sup>を用いる測定法が発表されている。蛍光色素を用いる
方法は、実験的な容易さにおいて利点があるが、膜電位
の算出には仮定が多く、また色素と相互作用があるもの
の測定はできないなどの欠点がある。K⁺イオン (または
Rb⁺イオン) の分布より求める方法は、理論的には仮定
が少ないが、アイソトープを用いる必要があり、また半
減期が非常に短く、取り扱いにくい。脂溶性イオンを用
いる場合、細胞内の分布は脂溶性イオンの膜への吸着、

並びに細胞内の小胞への吸着などを考慮する必要があり、
種々の膜電位計算法が考えられる。

本実験では、TPP⁺イオン選択性電極を用い、シナプ
トソームによるTPP⁺イオンの取り込みを種々の条件下
で測定した。それらの結果を用いて、TPP⁺が形質膜、
ミトコンドリア、および細胞質に分布するとして、それ
ぞれの分布量を簡単に求める方法を考えた。その方法を用
いて、得られた細胞内TPP⁺濃度より、種々の条件下
でのシナプトソームの膜電位を計算した。

2. 方 法

2・1 溶液

主に2種類の塩溶液を用いた。生理的塩溶液の塩組成
は、132 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
で細胞外液と考えられるもの (以後生理塩溶液と呼ぶ)

である。また膜電位を脱分極させるための溶液として、137mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.4) (これを脱分極塩溶液と呼ぶ) を用いた。

pH を変える実験では、緩衝液に Tris-citrate または Imidazole-HCl を用いた。クエン酸やイミダゾールの有無は膜電位に影響はなかった。Ca²⁺, Mg²⁺ の有無は膜電位に影響がなかったので加えなかった。

2・2 シナプトソームの調製

シナプトソームはラット全脳より通常の方法⁹⁾で調製した。ラット全脳を0.32M ショ糖でホモジナイズし、1400gで10分遠心した上清を12000gで20分遠心し、粗シナプトソームを得た。これを0.32M ショ糖でけんできし(30-40mg/ml), 用いた。得られたシナプトソームは調製後4-5時間以内に実験を終えた。

2・3 TPP⁺イオン選択性電極の調製

TPP⁺(tetraphenylphosphonium cation) 選択性膜は、イオン交換体として TPB⁻(tetraphenylboron anion) を用いて加茂ら^{10,11)}の方法にしたがいのように作製した。10mM TPB Na 2ml, 5%ポリ塩化ビニル 5ml, DOP (dioctylphthalate, 可塑剤) 1.5ml を直径 9 cm のシャーレ内でよく混和し、室温で放置して溶媒を揮発させた。TPB Na, 5%ポリ塩化ビニルはいずれもテトラヒドロフランを溶媒として溶かして用いた。

TPP⁺イオン選択性膜を直径1cmの塩化ビニル製の管にテトラヒドロフランで貼りつけ、電極とした。測定は Fig.1 に示すような装置で行った。

2・4 シナプトソームによる TPP⁺の取り込みの測定

生理的塩溶液あるいは脱分極用溶液 2.5ml を Fig.1 に示す装置のセルに入れ、TPP⁺を目的濃度 (TPP⁺濃度を変える実験以外の場合は 5μM) になるように加え、TPP⁺電極の電位 E_0 を測定する。次に、シナプトソーム 250μl

Fig.1 a) Diagram of apparatus for measuring the TPP⁺ uptake in synaptosomes.
b) Construction of selective electrode sensitive to TPP⁺.

(反応液中に終タンパク濃度として約4mg/ml) を加え、一定となった電位 E_1 を読む (Fig.2 参照)。エネルギー基質を後から加える場合は、さらに一定量の基質を加え一定となった電位 E_2 を読んだ。こうして得られた値 E_1, E_2 を用い、外液 TPP⁺ 濃度の変化を求めた。

2・5 TPP⁺の分布よりシナプトソームの

膜電位の計算

シナプトソームの膜電位の計算方法は、Scott & Nicholls⁶⁾ および Lichtshtein *et al*¹²⁾ の方法を参考にした。TPP⁺はシナプトソーム膜およびシナプトソーム内のミトコンドリア膜を自由に通ると考えられる。TPP⁺濃度 C_0 の塩溶液 (体積 V_0) に体積 V のシナプトソーム懸濁液を加え、TPP⁺濃度がシナプトソームに取りこまれて C_1 に変化したとき、TPP⁺の質量保存により (1)式が成立する。

$$V_0 C_0 = Q_s + (V_0 + v) C_1 + Ab \quad (1)$$

ここで、 Q_s , および Ab は、シナプトソーム内に取りこまれた TPP⁺量, および形質膜への吸着量である。 Q_s はシナプトソーム内のミトコンドリアへの取込み量 Q_m とシナプトソーム細胞質における存在量の和であるので、

$$Q_s = Q_m + V_s C_s \quad (2)$$

となる。ここで、 V_s および C_s は、細胞質の体積および細胞質中の TPP⁺濃度である。シナプトソーム内外およびミトコンドリア内外の TPP⁺の分布は、Nernst の式で

Fig.2 a) Response of the electrode to solutions of varying TPP⁺ concentrations.
b) Characteristic changes in electric potential of TPP⁺ selective in rode as a function of time.

Synaptosomes (P2) were added at the time indicated by the arrow. Incubation medium: 1) 137mM KCl and 20mM Tris-HCl (pH 7.4), 2) 132mM NaCl, 5mM KCl and 20mM Tris-HCl (pH 7.4).

表されるので、次の(3), (4)式が成立する.

$$C_s = C_1 \exp(F E_s / RT) \quad (3)$$

$$Q_m = C_s V_m \exp(F E_m / RT) \quad (4)$$

ここで、 E_s および E_m は、シナプトソームおよびミトコンドリアの膜電位であり、 V_m はミトコンドリアの体積である。 F , R , および T は、熱力学定数であり、また、ミトコンドリア膜への吸着は無視した.

(1)(2)(3) および (4) より E_s は (5) 式で表される.

$$E_s = (RT/F) \ln \{ [V_0 C_0 - C_1 (V_0 + v) - Ab] / C_1 [V_s + V_m \exp(F E_m / RT)] \} \quad (5)$$

(5) 式より、 C_0 , C_1 , V_s , V_m , Ab , および E_m が決まると膜電位が決定できることがわかる. 本実験では、 V_s , V_m として $3.2 \mu\text{l}/\text{mg}$ protein および $0.08 \mu\text{l}/\text{mg}$ protein の値を用い、 $E_m = -180 \text{ mV}$ とした (E_m の値を変えても Scott & Nicholls ら⁶⁾ と異なり、 Ab が変わるだけで E_s は変わらない). また、脱分極溶液中では、 $E_s = 0$ であり、(3) 式より $C_1 = C_s$ となるので、脱分極溶液中での、ミトコンドリアへの TPP^+ の取込量 Q_{mk} は (6) 式で計算できる.

$$Q_{mk} = C_1 V_m \exp(F E_m / RT) \quad (6)$$

Ab は対応する条件での脱分極溶液中での TPP^+ の取込みの測定を行い、(1)(2)(6) 式より得られる (7) 式を用いて計算した.

$$Ab = V_0 C_0 - (V_0 + v) C_1 - C_1 [V_s + V_m \exp(F E_m / RT)] \quad (7)$$

2・6 タンパク定量

タンパク定量はフェノール試薬法を用い、Lowry *et al*¹³⁾ の方法に従った.

3. 結 果

3・1 検量線

TPP^+ 濃度を変えて TPP^+ 選択性電極の電位を測定すると、Fig. 2 のような結果になった. $1 \mu\text{M}$ 以上では、傾きが 55 mV の直線であった. 異なる電極で測定を行った場合でも傾きは一定であったが、 $\text{TPP}^+ 0 \mu\text{M}$ での電位は、同一電極でも異なることがあるので、電位より TPP^+ 濃度を決定するときには、検量線を平行移動して使用した.

外液に TPP^+ を加えたときの応答は早いので濃度変化は取込み速度に対応している. TPP^+ 電極は、塩組成の変化により影響を受けず、また、本実験で用いた試薬により、 TPP^+ の検量線は障害をうけなかった^{10, 11)}.

Fig. 3 TPP^+ partition into synaptosomal plasma membranes and mitochondria: TPP^+ accumulated was measured under varying concentrations of synaptosomal protein.

Total TPP^+ accumulated ($\square$), was measured, and amounts of TPP^+ accumulated by mitochondria ($\triangle$) and by plasma membrane ($\circ$) were calculated with equation (6) and (7), respectively.

Fig. 4 Relation between membrane potential of synaptosomes and concentration of synaptosomal protein.

3・2 シナプトソーム内の TPP^+ の分布と膜電位

脱分極溶液中での TPP^+ のシナプトソームの取込みの測定より (3)(4)(6) 式より TPP^+ の細胞内の分配を計算し、Fig. 3 にシナプトソームのタンパク量を変えプロットした. Fig. 3 でわかるように、 TPP^+ はミトコンドリアによく吸着することは、Scott & Nicholls⁶⁾ や Lichtshtein *et al*¹²⁾ の結果と一致している. また、形質膜の膜電位を変えるよりは、ミトコンドリアの膜電位を脱分極させると思われる薬物により、 TPP^+ の再分配 (放出) が起こることと一致している.

同じ条件下で、生理塩溶液での TPP^+ の取り込みを測

Fig. 5 Dependence of TPP⁺ concentration on membrane potential in synaptosomes in the presence of 5.5 mM glucose (○) or in its absence (●).

定し、上述の膜への吸着量を用い(5)式より膜電位を求めた (Fig. 4). Fig. 3, 4 に示すように、ミトコンドリアや形質膜への TPP⁺ の取り込み量はタンパク量に依存し、膜電位はタンパク量に依存しないことは妥当な結果であり、この方法による膜電位測定の有効性を示している。

3・3 TPP⁺ 濃度変化とシナプトソームの膜電位

種々の TPP⁺ 濃度を用いてシナプトソームの膜電位を測定した (Fig. 5 参照)。シナプトソームに取り込まれた後の溶液中の TPP⁺ 濃度が 1 μM (検量線の直線部) 以上になるように、はじめの溶液中濃度を 5 μM 以上として行った。

Fig. 5 でわかるように、TPP⁺ が高濃度になると、膜電位は脱分極する。このことは TPP⁺ がそれ自体の分布によりシナプトソームの膜電位を消失させるように働くものと思われる。このとき溶液中にグルコースを加えると過分極がおこった。高濃度の TPP⁺ はグルコースによる過分極に対しては阻害しない。TPP⁺ が 5 μM で膜電位が大きく、TPP⁺ が増加すると膜電位が脱分極するので、以後の実験では測定できる最低濃度である 5 μM を用いるのがよいと思われる。

脂溶性イオン選択性電極による電位の測定において、TPMP⁺ (triphenylmethyl-phosphonium cation) などを用いる場合、TPB⁻ を加えると TPMP⁺ の取り込みの平衡時間が変化することが示され⁷⁾、TPB⁻ を溶液に加える必要があると言われているが本実験では TPB⁻ を加えても TPP⁺ の取り込みには変化がなかったので TPB⁻ は加えなかった。

Table 1 Effect of various substrates on membrane potential (*E_s*) in synaptosomes. All substrates added were 5.5 mM. Values are means ± S.D. from the number of experiments in parentheses.

	<i>E_s</i> (mV)
buffer only (control)	-56 ± 2.9 (27)
+ glucose	-65 ± 2.5 (5) *
+ fructose	-52 ± 3.6 (4)
+ mannose	-60 ± 4.4 (6) *
+ pyruvate	-68 ± 3.6 (4) *
+ lactate	-59 ± 2.5 (4)
+ succinate	-56 ± 1.2 (3)

**p* < 0.05 compared to control.

3・4 種々のエネルギー基質

溶液に種々のエネルギー基質を加えて測定を行い、Table 1 の結果を得た。脱分極塩溶液では、どの基質を加えても TPP⁺ の取り込みはみられなかった。生理的塩溶液では、脳の主要なエネルギー代謝基質であるグルコース、ピルビン酸^{1,14)} は膜電位を明らかに過分極させた。乳酸、コハク酸、フルクトースは膜電位を過分極させなかった。マンノースについてははっきりしないが、危険率 5% で有意差検定を行うと、加えた場合に control と有意の差があった。これらの結果は、ロードミン 6G を用いて得た結果と一致している¹⁵⁾。

Fig. 3 に示すように、TPP⁺ はミトコンドリアにも吸着される。コハク酸やピルビン酸はミトコンドリアの呼吸速度をかなり速くし^{1,14,16)}、ミトコンドリアでの膜電位変化がおきていると考えられるが、シナプトソームの膜電位変化には影響がなかった。このことは、ピルビン酸による TPP⁺ の取り込みは、ミトコンドリアの膜電位変化の効果ではないことを示している。

3・5 pH 変化と膜電位

溶液の pH を 4 から 9 まで変えて測定し、膜電位を求めた。Fig. 6 よりわかるように、酸性で膜電位は消失した。pH 7 以上ではほぼ一定であった。膜電位が 1/2 になるのは pH 5 付近であった。一般に、神経系の K⁺ チャンネルの作る膜電位の pH 依存性に、Fig. 6 はよく似ているので^{17,18)}、シナプトソームの K⁺ チャンネルも、他の神経のものと類似の構造をもっているものと思われる。

Fig. 6 Effect of pH in medium on membrane potential in synaptosomes.

Fig. 7 Effect of temperature on membrane potential in synaptosomes in the presence of 5.5mM glucose (○) or in its absence (●).

3・6 温度変化と膜電位

溶液の温度を5-35°Cで変えた場合、低温ではTPP⁺の取込みは遅くなったが、5°Cでも取込みは見られ、低温でも膜電位は存在していることがわかる。15°C以下ではTPP⁺の取込み速度が遅いので、30分たったときの値を測定したため、特に5°Cでは真の値より膜電位は小さくなっていると考えられる。Fig. 7でわかるように、15°C以上ではグルコースをエネルギー源とした過分極の際の膜電位、およびグルコースを加えないときの膜電位は一定値を示した。低温ではグルコースによる過分極がみられなくなっていく傾向がみられた。

4. 考 察

本実験では、TPP⁺イオンが、シナプトソームの形質膜、細胞質、およびミトコンドリアに分布するとして単純化して扱った。用いた粗シナプトソーム分画中には、ミエリンの破片や、シナプトソーム外に出たミトコンドリアも含まれている¹⁾が、それらはみかけ上、形質膜の

一部として取り扱った。

Fig. 2-Fig. 7に得られた結果は、シナプトソームの性質としては妥当と考えられるので、本実験で用いた仮定は、ほぼ成りたっていると考えられる。低温で膜電位がないとの報告もある⁸⁾が、低温でpHを変えて⁴²K⁺の分布がFig. 6と類似の結果である¹⁹⁾ことより、低温でも膜電位はあると思われる。Fig. 7よりわかるようにTPP⁺の透過は低温で非常に遅くなるのでTPMP⁺も30°Cと同じ測定時間ではほとんど取り込まれず、したがって膜電位が正しく測定できていないものと思われる。

Scott & Nicholls⁶⁾は、Rb⁺のアイソトープを用いて、シナプトソームの膜電位を測定し、その値を用いてTPMP⁺の濃度分布を計算し、シナプトソーム内ミトコンドリアの膜電位を-160mVと計算している。本実験では、ミトコンドリアの電位を-180mVとしてあるが、この値を変えても膜への吸着量の推定値が増加するだけで、シナプトソームの膜電位は変化しない。細胞質に蓄積される真のTPP⁺量は少ないが、ミトコンドリアへの吸着量は、細胞質の濃度に比例する(4式)ので、みかけ上、ミトコンドリアが細胞膜の体積を増加するように働き、シナプトソームのTPP⁺の全取込み量を増加している。

膜への吸着量(脱分極溶液での取り込み)は、調製した粗シナプトソームごとにばらつきはあったが、pH4の場合を除くと、pHや温度による変化はあまりなかった。このことは、ミトコンドリアの膜電位が変らない条件下では(特にミトコンドリアに作用する試薬を用いない場合は)、脱分極溶液でのTPP⁺の取り込みは、対応するすべての条件で行わなくてもよいことを示している。

今後、ロテノンなどでミトコンドリアの膜電位を変えた場合、本実験で用いた方法でシナプトソームの膜電位が測定できるか検討していきたい。

References

- 1) H.F. Bradford: "Handbook of psychopharmacology" (L.L. Iversen, S.D. Iversen, S.H. Snyder, eds) 1, 191 (1975) Plenum Press, New York
- 2) B.I. Kanner: *Biochemistry*, 19, 692 (1980)
- 3) A. Pastuszko, D.F. Wilson, M. Erecinska: *J. Biol. Chem.*, 257 (13), 7512 (1982)
- 4) M.P. Blaustein, J.M. Goldring: *J. Physiol.*, 247, 589 (1975)
- 5) T. Aiuchi, T. Daimatsu, K. Nakaya, Y. Nakamura: *Biochim. Biophys. Acta*, 685, 289 (1982)

- 6) I. D. Scott, D. G. Nicholls: *Biochem. J.*, **186**, 21 (1980)
 - 7) C. Deutsch, U. Rafalowska: *FEBS Letters*, **108** (1), 274 (1979)
 - 8) E. Hansson, I. Jacobson, R. Venema, A. Sellstrom: *J. Neurochem.* **34** (3), 569 (1980)
 - 9) V. P. Whittaker, I. A. Michaelson, R. J. A. Kirland: *Biochem. J.*, **90**, 293 (1964)
 - 10) T. Shinbo, N. Kamo, K. Kurihara, Y. Kobatake: *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, (2) 414 (1978)
 - 11) 邨次 誠, 加茂直樹, 小島陽之助, 須田昌男: 膜, **4** (5), 323 (1979)
 - 12) D. Lichtshtein, H. R. Kaback, A. J. Blume : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 650 (1979)
 - 13) O. H. Lowry, N. J. Rowebrrough, A. L. Farr, R. J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
 - 14) H. F. Bradford: *J. Neurochem.* **16**, 675 (1969)
 - 15) T. Aiuchi, M. Matsunaga, K. Nakaya, Y. Nakamura: *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 228 (1984)
 - 16) R. F. G. Booth, J. B. Clark: *Biochem. J.*, **176**, 365 (1978)
 - 17) B. Hille: *J. Gen. Physiol.*, **61**, 669 (1973)
 - 18) P. Shrager: *J. Gen. Physiol.*, **64**, 666 (1974)
 - 19) H. Weinstein, K. Kuriyama: *J. Neurochem.*, **17**, 493 (1970)
-