H⁺-ATPase のポンプ, ゲート, チャンネルの再構成*

香 川 靖 雄**

自治医科大学学生化学 〒329-04 栃木県南河内町

(昭和54年5月18日 於学会本館)

大変過分なご紹介をいただきましたが、ご覧のように、未だ若輩でございまして、このような高い所からお話をするというのは、何か恥しいように思います。生体膜は、下等なものから高等なものまで、共通な性質をもっております。この膜学会は、生物以外の方も大勢おられると思いますので、先ず、生物系の方は、充分ご存知のことが多いかと思いますが、最初に、一枚だけスライドで、今日の話しの中でポイントになるところを少しご説明させていただきます。

生体膜のなかのタンパク質は、よくわかっていなかったのですが、最近では、これからお話しいたしますように、抽出をされて、一次構造まで解明されたものが、多数あります。これらは、無生物体触媒でありますとか、高分子とかなり違っています。何といっても、特定の物質、これをかりに物質Aとしますと、これと特異的に反応する性質がタンパク質にはあります。すべての生体膜の特異的なタンパク質は、Fig. 1 にかかげました酵素と、受容体、それから輸送体と、このように大きく、3つに分けられるかと思ひます。それらは、いずれも特定のいわゆる活性中心をもっておるわけです。酵素というのは、ご存知のように、Aという物質を活性中心の上において、特異的に、その分子の1ヵ所だけを変化させまして、B

という物質にする (Fig.1左)。それから、受容体 (Fig.1中) といいますものは、やはり結合の中心はもっておるのでありますが、化学反応は行わない。Aが結合されることによって、このタンパク質の高次構造が変って、情報が伝えられるという性質をもっております。特に受容体は、生体膜に局在しているものが多いのですが、酵素や受容体は、必ずしも生体膜には局在していません。そして、特に酵素については、今まで非常に詳しい研究が、可溶性のものにおいて行われてきたわけです。次に輸送体ですが、ポンプとか、ゲートとか、チャンネルは、すべてこの輸送体 (Fig.1右) に関係した概念です。輸送体の物質結合部位は、フィルターという名前で統一に呼ばれております。フィルターの化学的な構造、実際の高次構造も、最近ではわかってきておりますが、これは、ただ膜に孔があいているというのではなくて、特定の物質しか通さない。Aがまた、ビタミン B₁₂ のような、極度に大きい分子であっても、他の分子がそれに伴って、一緒に通過してしまうというようなことにはあり得ない。こういう意味で、この輸送体というのは、生体膜のタンパク質の中で非常に独特のものであります。しかし、この輸送体というのは、活性を測定するというのが、今までの酵素学の方法ではできないわけです。酵素では化学的な変化を使って測定できますし、それから、受容体は物質をアイソトープでラベルしたものを結合させるということで測定をすることができますけれども、輸送体場合には、本当に生体膜を再構成して、輸送をみなくては行けないのです。今、このように3者に分けたわけですが、一つの機能は3者が共働して発現している場合も多いのです。エネルギーの転換を例にとりましょう。化学的なエネルギーの転換を行っているのは、何といっても酵素です。ここで作用している ATPase というのは、ATP を分解する酵素ですから、酵素としての性質が一つあります。それから、ATPase の分子の中には、細胞の中のATP の量を測って、自分の活性を変えるための情報を伝える受容性としての性質があります。さらに ATP の分解のエネルギーを用いて水素イオンを通す

Fig. 1 Three kinds of Functional proteins of biomembrane

(香川靖雄: 第20回日本医学会総会講演より)

* Reconstitution of Pump, Gate, and Channel of H⁺-ATPase. (昭和54年5月18日(土)於学会本館)

** Yasuo Kagawa: Department of Biochemistry, Jichi Medical School, Minamikawachi, Tochigiken, Japan 329-04

Fig. 2 Electron microscopic appearance of $TF_0 \cdot F_1$ and reconstituted vesicles. $TF_0 \cdot F_1$ (A) and the reconstituted vesicles (B) were negatively stained with 2% phosphotungstate, pH 7.0, as described. in Y. Kagawa, N. Sone, M. Yoshida, H. Hirata and H. Okamoto : *J. Biochem.*, **80**, 141 (1976)

輸送体としての働きがあります。この3つの、本当は分離した概念が、一つのタンパク質の中に入っているというわけであります。こういうタンパク質がいろいろ知られております。例えば、この3者のうち2つが組み合わせたものの例として、アセチルコリンレセプターがあります。伝達物質を吸着して、アセチルコリンを受け取る場所は受容体でありますけれども、これを精製して単離した分子の中に、ナトリウムイオンを通すチャンネルも一緒にくっついてあります。実在の生体膜のタンパク質には、こういうものがいくつも有ります。サイクリックAMPというものを造るアデニルサイクラーゼのタンパク質には、生体膜の中では、普段は受容体と結合していて、受容体側がホルモンの信号、伝達物質の影響、アセチルコリン、そういうものの影響を受けて、酵素の活性が速くなるというわけです。

さて、今のATPaseというものは、最初に1963年に抽出することができました。その時に、電子顕微鏡で見たところが、こういう妙な格好をしていました(Fig. 2)。そして、この玉になった部分(F_1)と、柄が付いている端側の部分が見えます(Fig. 2, A_1A_2)。この端の部分

(F_0) はきわめて疎水性で、こういう疎水性の部分だけが結合してこのような集合体になります。構造をもっている $F_0 \cdot F_1$ から、この玉の部分(F_1)を引き離すことができます。これは私より前に、ラッカー先生の教室で精製されていた F_1 です。 F_1 にATPaseの活性があることはすでにわかっていたのです。それを、その界面活性剤を使って、膜からおだやかに $F_0 \cdot F_1$ の部分をはささないで、このままもってくると、非常に性質が違います。脂質が活性に不可欠ですし、それからいろいろな酸化リン酸化のエネルギー転換阻害剤で、このATPaseの活性が阻害される。この $F_0 \cdot F_1$ はあまりにも不溶性であるし、不均一なものでありましたけれども、とにかく、こんなものがとれてきました。最初は、これが酸化リン酸化のエネルギー転換の担い手ではないかと、いろいろな傍証から推定されていきました。しかし、そのうちに、何とかして直接的証明をしたいということになりました。先ほどこいましたような膜の中に、このATPase($F_0 \cdot F_1$)をとり込んで、ATPを分解することによって、ATPのエネルギーを使って、水素イオンを輸送することが証明できました(Fig. 3)。それは、膜タンパク質に脂質をただ加えただけでなくて、脂質と界面活性剤を加えて、それからタンパク質もこの中に加えて、そして透

Fig. 3 H^+ -ATPase を含む再構成小胞の ATP-Mg の分解による H^+ の輸送.
(Y. Kagawa, *B. B. A.*, **265**, 297 (1972))

析その他の方法で徐々に界面活性剤を除いて、いわゆるリポゾームを造るのです。タンパク質を小胞の中にとり込んで Fig. 2 の B_1 B_2 に示す $F_0 \cdot F_1$ 小胞を作ると、ATP のエネルギーを使って、輸送エネルギーに変えるということが実際に証明できるわけでありす。

Fig. 3 は pH メーターの測定記録です。Fig. 3 の B_1 B_2 で示しましたような再構成小胞を、pH メーターの中に入れておきます。これにバリノマイシンのような K^+ のキャリアを加えた後に ATP と Mg を加えると、その加水分解に伴って、水素イオンが小胞の中に入っていきます。ATP が無くなってしまえば、小胞の H^+ がもれてきますが、ATP を加えて H^+ の輸送をくり返すことができます。いわゆる、酸化リン酸化の除共役剤、これは π 結合をたくさんもちました弱酸、これを膜に加えますという、貯えられたプロトンが外にもれてしまいます (Fig. 3 左の FCCP の所)。これは、ミッチェルの仮説 (1978 年ノーベル賞受賞) を、非常にはっきりと示した実験であったわけです。その膜が FCCP によって H^+ 透過性になってしまいますと、今度は、ATP, Mg をいくら加えましても、さっきのようなプロトンの蓄積は見られないのです。つまり、これはプロトンが ATP, Mg の影響によって、膜に吸着されやすくなったのだとか、そういうことでは、とても説明のできない性質で、 H^+ の輸送現象であることが確立されました。

$F_0 \cdot F_1$ の電子顕微鏡の図をもっと大きくしたものが Fig. 4 です。ここには、ATP を分解する部分 (F_1)、それからプロトンを通す部分 (F_0) があります。また、プロトンがもれないように、止めておくゲートと呼ばれる部分が、理論的にもなくてははいけないのです。 $F_0 \cdot F_1$ の論文を見まして、ミッチェル博士が、 F_0 はプロトンを通すチャンネルにはかならないということを非常にはっきりとした形で論文に書きました。私どもはそれによって、プロトンの輸送を、本当にミッチェルがいうように起こるかどうかなんかということ再現実しようとしたわけです。それでは、 $F_0 \cdot F_1$ を個々のサブユニットにバラバラにして、

Fig. 4 Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 936 (1977) より

1 つ 1 つの機能をしらべて、本当にどこでどういうふうな化学的なエネルギーが物質輸送のエネルギーに変えられるか、話をほりさげていこうとしました。ところが、ここには大変大きな困難があるわけです。常温菌、あるいは高等動物、高等植物などの生体膜のタンパク質というのは、非常に変性しやすいのです。理論的には、膜のタンパク質を 1 つ 1 つ分離すれば良いように思いますが、実はそういうふうにはいなくて、とり出せば、生体膜のタンパク質はほとんどが変性して失活してしまうのです。ですから丈夫なサンプルはないかということで、日本に帰りましてから、三菱生命科研の大島氏にいろいろな好熱菌をもらいまして、この研究に一番適した PS-3 という菌を用いたのであります。

界面活性剤の SDS (ドデシル硫酸ソーダ) と呼ばれるものが生体膜をとかすのに大変便利です。どんな生体膜のタンパク質でも、SDS さえ加えれば、必ずそのサブユニットに分かれ溶けてくれます。先ずその SDS に対して、どれくらい丈夫かということをしらべてみますと (Fig. 5), この TF_1 というのは好熱菌からとった F_1 、それから F_1 、これは牛からのものです。 F_1 は 0.01% という非常に低い濃度で、バラバラにこわれてしまっていて、しかも、後で SDS を除いても元に戻らないのです。ところが、私どもの TF_1 では、5~6 倍の濃度を加えないと失活をしないというだけではなくて、尿素の存在下、イオン交換樹脂を通して SDS を除きますという、ま

Fig. 5 Kagawa, Y.: Mosbach Colloquium, pp 195, Springer Verlag (1978)

Fig. 6 TF₁ の CD スペクトルの温度による変化
香川, 吉田 (1977)

た、元の TF₁ が活性をもった状態でできてきます。そこで、好熱菌を使って実験することになりました。Fig. 6 は TF₁ の円偏光二色性スペクトルです。普通の F₁ ですと、低温にしても (2°C) バラバラになってしまうし、それから 30°~40° になりますと、やはり失活してしまいます。TF₁ は低温にも非常に強いタンパク質であります。本当に、TF₁ の二次構造をなくそうと思えば、96°, 35 分で、沸騰水浴中に近く置かないといけません。

それから、もう一つ大事な要素は、いくらタンパク質が丈夫であっても、生体膜の脂質の方が弱ければ、丈夫な再構成膜はできません。しかしながら、生体膜の脂質も、好熱菌においては、常温とは性質を異にしております。不飽和結合が一般生体膜の脂質に多く存在しますが、これが酸化によって破壊されやすいので好熱菌には存在

Fig. 7 好熱菌 PS₃ の脂質 (ホスファチジルグリセロール) のモノアセチルジグリセライドのマスプロマトグラフィー.
Kagawa Y. and Ariga, T.: *J. Biochem.*, **81**, 1161 (1977) より

しないのです。Fig. 7 はマスプロマトグラフィーで、この好熱菌の脂質のうち、ホスファチジルグリセロールを分析したものです。モノアセチルジグリセライド (MADG) のガスクロマトグラフィー後に、ケミカルアイオニゼーションで、マスのグラフメントとして、それを計算機で集計しまして、その成分の分子種がわかります。例えば、1 番のピークというのは、分子は炭素数 15 と 14 の飽和脂肪酸をもっている。2 番のピークというのは 15 と 15 からできていることがわかります。これでいかに膜の脂質は特殊で丈夫なものがおわかりいただけたかと思います。この脂質は他にホスファチジルエタノールアミンやカルジオライピンを含んでいます。

それから、膜の ATPase というのは、F₀・F₁ の他にもエネルギーを変換するものが多く、NaK-ATPase や ATPase などがある例ですが、結晶化されたものが一つもなかったのです。ただ、好熱菌の場合は F₁ を結晶化することができました。Fig. 8 の中に一つの六角形に見えておりますのが (直径約 90 Å) この ATPase の分

Table 1 F₁ と TF₁ 中の極性アミノ酸の含量.Kagawa Y. *et al.*: Biochemistry of Thermophilic (Friedman M. ed.) Academic Press (1978) より.

	Whole oligomer ($\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$)*		Subunit α		Subunit β		Subunit γ		Subunit δ		Subunit ϵ	
	F ₁	TF ₁	F ₁	TF ₁	F ₁	TF ₁	F ₁	TF ₁	F ₁	TF ₁	F ₁	TF ₁
Glu+Gln	404	471	58	64	58	66	29	40	22	30	5	11
Asp+Asn	273	307	42	44	35	41	27	29	12	15	3	8
Arg	161	202	27	27	19	27	16	17	4	16	3	7
Total number of Amino Acid	3,393	3,407	504	487	459	461	303	278	147	189	54	96

* The values are expressed as numbers of residues per mole of subunit or oligomer. (*J. Biol. Chem.* **254**, 9525 (1979)).
The data on F₁ (beef heart F₁) are calculated from the values of A. F. Knowles and H. S. Penefsky (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 6624.

Fig. 8 電算機画像解析法による TF₁ の結晶中の分子構造.
Wakabayashi, T., Kubota, M., Yoshida, M., Kagawa, Y.: *J. Mol. Biol.*, **117**, 515 (1977)

Fig. 9 TF₁ のサブユニット, SDS ゲル電気泳動図.
Kagawa, Y.: Mosbach Colloquium pp 195
Springer Verlag (1978) より

子です.

これは東大の物理の講師をしておられます若林健之氏と共同で行ないました. 今日では, 生体膜の生化学に非常に有力な武器として画像解析法があります. 二次元に規則的に配列をした構造があれば, その分子の形を見ることができる. 詳しいことは省略いたしますけれども, 若林講師がいろいろな点で新しい工夫を加えて電算機で

算出しました.

F₁ は, 五種類のサブユニット (α , β , γ , δ , ϵ) からできております. これを飽和の尿素の存在下に, イオン交換樹脂で, このサブユニットを全部分けてまいります (Fig. 9).

α , β , γ , δ , ϵ の五種類のサブユニットは驚くべきことには, あらゆる独立の生物の F₁ にも必ず含まれてい

るわけです。ですから、ビールのような寄生をする生物以外は、人間であろうとバクテリアであろうと、全部この酵素を含んでいるということがわかりました。これは、私どもが研究を始めた時には、想像もつかなかったことであって、F₁ はエネルギー変換の一番主役をしている酵素だと、今日では考えられています。

アミノ酸分析をして、好熱菌の F₁ が非常に特徴とするところは、グルタミン酸、アスパラギン酸、あるいはアルギニンのようなイオン結合を造るアミノ酸が非常に多いのです。これは、Table 1 のようにすべてのサブユニットに共通です。タンパク質が、イオン結合によって安定化されていますから、この好熱菌のタンパク質は、工業的に利用されるということも予想されるわけでありす。

それから、このサブユニットを混ぜていきますと、ATPase の活性が、再構成されてきます (Fig. 10)。五つのサブユニットを組み合わせて、その性質をみるには、5 ビットの実験なのです、32通りあります。

そうすると、βサブユニット含む場合だけが、活性があります。βの一体どこと ATP が作用しているかを調べてみますと、CD のこのスペクトルでは、Fig. 11 のようにチロシンに相当する場所に、非常に強いピークが出てまいります。

私どもは、今カリフォルニア大学の Allison と共同で β-サブユニットの研究をすすめています。Fig. 12 には、βサブユニットの活性中心構造が示してあります。阻害

Fig. 10 サブユニット α, β, γ からの TF₁ の再構成。
Yoshida M., Sone, N. Hirata, H. and Kagawa, Y.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 3480 (1977)

Fig. 11 β-サブユニットと ATP 混合物の円偏光二色性スペクトル (太田, 坪井, 吉田, 香川: *Biochemistry*, 1980, 参照)

Fig. 12 β-サブユニットの活性中心の構造
Kagawa Y.: Reconstitution of H⁺ ATP ase
第11回国際生化学会講演 (1979) より。
(アミノ酸配列は Allison による)

剤でチロシンをブロックいたしますと、ATP 活性もなくなります。それから私どものサブユニットを、アルゼンチンの Vallejos 教授と共同研究してわかったことですが、アルギニンに特異的な阻害剤によって ATPase の活性が失われるのです。分子に、1 コとか、数コこの場所につただけで活性が失なわれます。この活性中心あたりに、プロトンの移動を引き受けるような、こういう残基（カルボキシル、ヒスチジン、アルギニンなど）があります。ここで ATP の合成エネルギーと、プロトンの移動エネルギーがこの活性中心で変換されていると現在想像して実験を進めております。

さて、今度は H^+ のチャンネル (F_0) の方でございますが、チャンネルにつきましては、タンパクの活性を測定する良い方法はなかったわけです。そこで TF_0 (好熱 F_0) を Fig. 13 のように、リポソームの中に入れておいて、プロトンの透過をみます。膜にエネルギーを何らかの形で加えなければいけないわけですから、リポソームの中に KCl を入れておきまして、これを特異的に運ぶ

Fig. 13 H^+ のチャンネルの活性の測定法, pH メーターで H^+ の流入を測る。
(香川靖雄: 生体膜と生体エネルギー (第2版) 東大出版 (1979年))

バリノマイシンを加えますと、自然に、濃度差に従って K^+ が流出をします。このエネルギーを使って、膜に膜電位が形成されます。外側が(+), 内側が(-)になります。そして内側に向かって、プロトンが TF_0 を通って流れます。ちょうど、酵素の活性を測るとき酵素量に比例して活性が上ると同じように、この TF_0 の量と正比例いたしまして、プロトンの透過の初速度が上昇するので、チャンネルの活性を測ることができます。

それから、先程の脂質を使って、Fig. 14A に示すように H^+ の輸送速度の温存依存性をしらべますと、キャリアかチャンネルかの区別ができます (Fig. 14B). H^+

Fig. 14A F_0 (黒) と FCCP (H^+ の移動性キャリアー, 白) の H^+ 輸送速度の Arrhenius プロット. PS3 のリン脂質 (四角) では FCCP に相転移温度 $22^\circ C$ 以下で明瞭な速度低下がある. 大豆のリン脂質 (丸) では相転移温度は低く、このような変化は見られない。
Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Yoshida, M., and Kagawa, Y.: *J. Biol. Chem.* 252, 6125 (1977)

Fig. 14B 移動性キャリアー (例 FCCP) (左) と結チャンネル (例 F_0) (右)

のチャンネルである F_0 では、温度を下げて H^+ 輸送速度は急激に低下しません。しかし膜内を移動して H^+ を運ぶ FCCP とよばれるキャリアーは、PS3 の脂質分子が運動を制限される $22^\circ C$ の転移温度以下では急激に H^+ 輸送能が低下します。これが F_0 がチャンネル (H^+ の孔) であるということを証明したものであります。

それから、 TF_0 の成分ですが、DCCD という特異的な阻害剤があり、カルボキシル基と結合して H^+ の輸送

Fig. 15 DCCD 合タンパク質の H⁺ フィルター部分の化学構造.
Sone, N., Ikeba, K., and Kagawa, Y.:
FEBS Lett., **97**, 61 (1979) より改変

を止めます。DCCD を結合するサブユニットと, TF₁ を結合するタンパク質と, この 2 つを活性をもったまま分けることができました。

今年になりましたから, 好熱菌 PS3 の DCCD 結合サブユニットの全構造がドイツのセバルトとの共同で決定されました。これは, 今まで知られたタンパク質の中で, 一番疎水性の強いものです。クロロホルムメタノールにしか溶けないタンパク質であります。どうしてプロ

Fig. 16 H⁺ ゲート活性の測定. Fig. 13 の TF₀ リボソームに TF₁ のサブユニットを加え, H⁺ 流出の阻害をしらべる.
Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., and Kagawa, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 936 (1977)

トンだけがこのように通過するかといいますと, Fig. 15 のように疎水基に囲まれた 3 種の極性基があって, ここを伝わると考えられます。事実カルボキシル基を DCCD で阻害しても, テトラニトロメタンでチロシンを阻害しても, アルギニンをグリオキサールで阻害しても, プロ

Table 2 F₁ の五種のサブユニットの機能

Kagawa, Y., Sone, N., Hirata, H. and Yoshida, M.: *J. Bioenerg. Biomembr.* **11**, 39 (1979)

Subunit	α	β	γ	δ	ϵ
合 成 Net ATP synthesis*	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
H 輸 送 H ⁺ -transport by ATPase*	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
P 交 換 ³² Pi-ATP exchange*	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
触 媒 ATPase catalytic activity	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
関 門 H ⁺ -gate activity*	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
F ₀ 結 合 Binding to F ₀	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
N ₃ 結 合 Conferal of N ₃ sensitivity*	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
安 定 化 Stabilization of ATPase*	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
通 過 孔 H ⁺ -channel activity	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
結 合 中 心 ATP, ADP binding activity	Kd 小	Kd 大	(-)	(-)	(-)
阻 害 剤 Aurovertin binding activity**	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
阻 害 能 ATPase inhibitory activity**	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

*Confirmed only in the TF₁ by reconstitution. **Confirmed in *E. coli* F₁

Fig. 17 H⁺ ATPase (F₀·F₁) を含むリポソームにおける ATP と H⁺ 輸送間のエネルギー変換.

- A. ATPase 反応による pH 差の形成, 9AA (9 アミノアクリジン) は pH 差に伴って移動する.
 B. ATPase 反応による膜電位差の形成. ANS (アニリノナフタレンスルホン酸) は膜電位で移動する.

トンの流れはストップします. こうして H⁺ はこれらの残基を通して移動するということが79年になりましたから, ほぼ確実になってまいりました.

それから先ほどのゲートの活性であります, これは F₀ を含んでおりますリポソーム (Fig. 13 参照) を造りまして, そこにサブユニットのいろいろなコンプレックスを加えてしらべます (Fig. 16). γ, δ, ε を含んでいる組み合わせを加えると, H⁺ 流出が止まるので, これがゲートであることがわかりました.

今までの研究によって, F₁ の中の五種のサブユニットの機能というものがわかってきました. Table.2 の内容をごく簡単に申し上げますと, α, β, γ, δ, ε の5つがそろわなければ, ATP を合成する, あるいはプロトン輸送するということではできません. しかしながら, ATP 結合活性は, α または β であるとか, それから N₃ 結するものは γ であるとか, いろいろな性質がここであって来たわけでありまして.

ATP を結合するのは, アンチ型の ATP でないと結合しない. これは α, β ともにそうであります.

それから幸いに, TF₁ では, α, β など活性をもったまま単離できますので, それを使って, これを, どちらがどういう高次構造に影響を与えているかということの証明をすることもできました.

それから, この一連の実験の最後に, このような方法を使って, ATP が実際合成されるということ, 二三のスライドでお眼にかけます. Fig. 17 に示すように, H⁺ ATPase は可逆的に H⁺ を外から内に運ぶので, 逆にリポソームの中を酸性にしておきまして, 外側をアルカリ性にするという処置で, pH 差 (ΔpH) H⁺-ATPase を含んだ小胞で, ATP が合成されることになります. この結果を要約いたしましたのが Table.3 です.

Fig. 17 の B でわかりますように, 電圧をかけること (膜電位 ΔΨ の形成) によっても H⁺ を移動させることができます. 膜に H⁺ の電気化学的なポテンシャル差

(ΔμH⁺ = ΔΨ - ZΔPH) を生じるわけですから, これによっても, 実際 ATP の合成が起こるはずですが. これは葉緑体では, このような実験が成功しております (Fig. 18). 現在のところ, 再構成実験にはいろいろ難点がありまして, 未だ成功しておりません (この講演後に成功, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 362 (1979)). 電圧をかけるというのは, 非常に時間分解能 (time resolution) の良い反応でございますから, 酵素の実際反応している

Table 3 H⁺-ATPase を含んだ小胞の酸点基処理による ATP 合成

小胞の処理法	ATP 合成量 (nmol/mg タンパク質)
pH 5.5 → pH 8.3	53.3
pH 8.0 → pH 8.3	5.4
-ADP (ATP の原料)	3.9
+DCCD (エネルギー転移阻害剤)	3.6
+FCCP (除共役剤)	1.9

Y. Kagawa, K. Ohno, M. Yoshida, Y. Takeuchi, N. Sone: *Fed. Proc.*, **36**, 1815 (1977)

Fig. 18 外部電場のエネルギーによる ATP 合成 (H. T. Witt の講演 (1978) モスバハハコロキウムより改変)

電場内の粒は F₁-ATPase 分子であり, 右側の膜構造に電圧をかけたときだけ高次元構造の変化と ATP の合成がみられる. 電圧は30秒おきに30ミリ秒ずつパルス状に与える.

香川靖雄: 生体膜と生体エネルギー 第2版 (1979) 東大出版会

Fig. 19 生体膜における物質, エネルギー, 情報の伝達変換と H^+ -ATPase

香川靖雄: 日本臨床. **37**, 2702 (1979)

ことが, 様子がよく分析できるはずであります。

このように, ATPase に生じた膜の H^+ 電気化学ポテンシャル差 ($\Delta\mu H^+$) は, 物質の変換, イオンの輸送, あるいは情報の伝達, あるいはべん毛運動などと多

Fig. 20 大腸菌の走化性. 試行錯誤による接近法を行う。誘引物質の濃度勾配が上昇する方向に進んでいるときは直進 (smooth), 減少するときは一時停止して方向を変え (tumble), また直進を再開する。

香川靖雄: 第20回医学会総会講演(1979)

く形のエネルギーに転換される, 非常に広い現象であるということが, わかってきました (Fig. 19)。

今までエネルギー変換だけをお話ししましたが, 微生物は, 実は記憶, 判断などの情報処理の能力をそなえております。それは, 人間のような高等なものではありませんが, その基本となる分子的機序も神経細胞に見られる, 膜電位の変化, 膜の受容体, サイクリック AMPなどを介する点で細胞は共通です。それで, 現在, 走化性の研究を通じて情報処理機構がしらべられ, 細菌ほど研究が進んでおります。

例えば Fig. 20 にみられるように, 細菌は誘引物質の部分に向かって進んでいきますが, これは人間の感覚器よりはるかにすぐれた受容体をもっており, 10^{-6} M 程度の濃度差を感じます。濃度勾配を検知するためには始めの濃度を記憶していて, しばらく直進してから濃度を測り最初より低下していれば方向をかえるのです。

簡単に申しますと, 外界の情報を受容する, そして, エネルギーを変換して, 最後に $\Delta\mu H^+$ のエネルギーで, 運動を起こしていく。それに関するタンパク質についての詳しい研究が進んでまいりました。微生物を使いますと, 遺伝子操作等の方法によって, その情報を処理をしていくタンパク質が簡単にわかるからです (Fig. 21)。

Fig. 21 走化性の情報処理機構. 多数の末端受容器よりの情報を伝達し, 一時的に記憶し, 過去の入力や他の入力と比較し, 選択し, 最後に中央の処理機構において直進か回転かを決定する

香川靖雄: 第20回医学会総会講演 (1979)

Fig. 22 輸送のポンプ, ゲート, チャンネルの再構成 (Kagawa, Y.: Reviews on Bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **505**: 45~93, 1978).

私の今お話ししました H^+ ATPase の実験を要約いたしますと, H^+ ATPase は多くのサブユニットからできていて個々のサブユニットが, 各々異なった役割を担っています。それを精製した後に F_0 で膜の中にチャンネルを造り, $\gamma\delta\epsilon$ でゲートを造り, 最後にポンプの α, β を結合させるということによって, レギュレーションでありますとか, エネルギーの変換とかが段階的に再構成されてきます。従来は生理学的な概念にすぎなかったチ

ャンネルやゲートが物質としてとり出され性質がしらべられました。情報の転換でありますとか, 物質の輸送などもチャンネル, ゲート, ポンプなどという非常に共通の性質をもっているタンパク質に担われていることがわかってきたわけであります。

ご静聴ありがとうございました。

(参考文献・香川靖雄: 生体膜, 岩波全書, Ann, New York Academy of Science, (1980))

生物物理化学実験入門 I. II 渡辺格・島内武彦・京極好正 共編

1979, I A 5 判, 358頁, 3200円; II A 5 判, 350頁, 3200円, 培風館

現在まで広範囲な分野の研究者が, 精力的に生物学や生物化学の研究にとり組み, 生命現象を次第に解明するとともに, その成果は, 医学, 農学, 薬学, 工学の研究にも応用されている。このことはこの分野における新しい各種測定技術の開発を生み, その応用は広範囲に拡大するに至った。このなかで, 特に, 生物物理化学実験方法における進歩には著しいものがある。本書においても, その章項目は, 1. 遠心沈降と拡散, 2. 密度勾配遠心, 3. 電気泳動, 4. 流動複屈折, 5. 準弾性光散乱法, 6. 熱測定法, 7. 界面現象, 膜物性, 8. X線解析, 9. 電子顕微鏡, 10. アイソトープ, 11. 紫外・可視スペクトル, 12. ジャンプ法, 13. 旋光分散, 円偏光二色性, 14. 赤外・ラマンスペクトル, 15. 電子スピン共鳴, 16. 核磁気共鳴, 17. 光電子分光, 18. メスバウアー効果, 19. 小型コンピュータの利用, と多岐にわたり, 生命現象の究明に必要とされる物理化学的方法をほぼ網羅

している。各章項目について, それぞれの専門家が, 多くの図や写真を用いわかりやすく解説しているので, 初心者でも最新の生物物理化学実験方法を容易に理解できるように書かれている。しかも, 最新のデータを織りまぜた具体例をもとに各章が説明されているので, すでにこの領域で活躍している研究者にとってもきわめて有益と考えられる。特に, これから生体膜の研究を始めようとしている学生や研究者には, 基礎的な実験方法の他に, 膜物性などの解明のため実験方法の章も設けており, 参考になるであろう。また, 各章にはそれぞれの実験方法に関する最近の文献や著書を多く引用してあり, さらに詳しく調査する必要がある場合には役に立つと考えられる。生物物理化学実験方法の原理から実際に研究室で実験する場合の心得までを懇切に述べられている好著であり, ぜひ一読をおすすめする。

(東工大資源研 軽部征夫)