植物細胞における膜電位の発生機構と制御

田 沢 仁・新 免 輝 男

東京大学 理学部 植物学教室 〒113 東京都文京区 7 丁目 3-1

Mechanism and control of electrogenesis in plant cells

Masashi Tazawa and Teruo Shimmen

Department of Botany, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113

To study the electrogenic mechanism of the plant plasma membrane, intracellular chemical composition of *Chara australis*, a Characeae, was modified by the intracellular perfusion. It was suggested that the H^+ -extruding pump which is fueled by $Mg\cdot ATP$ is operating in the electrogenesis. Activity of the H^+ -pump was maximum at pH_o 5.4 – 8.4 and at pH_i 7. Light activates H^+ -pump and hyperpolarizes the membrane (light-induced potential change; LPC). Since LPC was not elicited in chloroplast-free *Spirogyra* cell which was prepared by cell-centrifugation, involvement of photosynthesis in LPC was concluded. Importance of electron transport in photosynthesis was suggested.

There is another mechanism of electrogenesis in *Chara* cells. When internal ATP or Mg^{2+} concentration was lowered greatly, the plasma membrane depolarized. When such a cell was stained with neutral red, a rapid light-induced potential change (rLPC) was observed. On illumination the membrane potential approached K^+ -equilibrium potential across the plasma membrane and K^+ -channel inhibitors suppressed rLPC, evidence that rLPC is caused by activation of K^+ -channel. When the cell was made chloroplast-free by the centrifugation, rLPC was removed, and it was recovered by introducing spinach chloroplasts into the chloroplast-free *Chara* cell. Involvement of electron transport in rLPC was also suggested.

1. 序 論

2. 材料と方法

3. 結 果

3.1 $Mg\cdot ATP$ 依存の電位発生

3.2 $Mg\cdot ATP$ 非依存の電位発生

4. 考 察

1. 序 論

近年、植物細胞の原生質膜電位には、イオンの拡散電位に加えて起電性イオンポンプの活動によって発生する成分があることが明らかになってきた。そのために実測される膜電位がどのイオンの平衡電位よりも負の値をとることが多い。イオンの能動輸送が電気的に中性でない場合、輸送に伴って膜電位が発生する。植物細胞において最も一般にみられるのは H^+ を放出するポンプである。カサノリでは Cl^- を吸収する起電性イオンポンプが知られている¹⁾。いずれの場合もポンプは細胞内を負にするように働く。車軸藻類においても Kitasato²⁾ によ

り起電性ポンプの存在が示唆され、以後これを支持する実験結果が増えつつある³⁻⁵⁾。光合成植物では H^+ ポンプが光によって活性化されるために細胞を光照射すると膜電位が負の方向に変化する(光電位反応)^{6,7)}。

起電性ポンプによる電位発生の機構を解析するために2つの等回路モデルが提唱されている。いずれの場合もイオンの拡散チャンネルと平行にポンプチャンネルが並んでいる (Fig. 1)。(a) は電圧源モデルと呼ばれ、ポンプチャンネルは起電力 (E_p) とコンダクタンス (g_p) より成る。 E_a と g_a は拡散チャンネルの起電力とコンダクタンスである。この場合膜電位 (E_m) は次式によって計算される。

Fig. 1 起電性ポンプをもつ膜の電氣的等価回路

a: 電圧源モデル, b: 電流源モデル

E: 起電力, g : コンダクタンス, d : 拡散チャンネル, p : ポンプチャンネル, I_p : ポンプ電流, E_m : 膜電位.

$$E_m = \frac{g_d}{g_m} E_d + \frac{g_p}{g_m} E_p \quad (1)$$

$$g_m = g_d + g_p \quad (2)$$

ポンプによって運ばれる電流 (I_p) は (3) 式によって得られる.

$$I_p = \frac{g_d \cdot g_p}{g_m} (E_d - E_p) \quad (3)$$

(b) は電流源モデルと呼ばれ, ポンプは理想的な電流源として働く. 膜電位は式 (4) によって決まる.

$$E_m = E_d + E_a \quad (4)$$

$$E_a = -I_p \cdot \frac{1}{g_a} \quad (5)$$

ここで E_a はポンプによって発生する電位である. ポンプ電位は (6) 式によって計算される.

$$I_p = -E_a g_a = (E_d - E_m) g_a \quad (6)$$

どちらのモデルが正しいかについては研究者の間で, 意見が一致していない.

H^+ ポンプの活動により原形質膜を介しての H^+ の電気化学ポテンシャル ($\Delta\bar{\mu}_H$) が発生するが, これは電位勾配と H^+ の濃度勾配より成り次式より計算できる.

$$\Delta\bar{\mu}_H = E_m + \frac{RT}{F} \Delta pH \quad (7)$$

$$(\Delta pH = pH_o - pH_i)$$

Mitchell の化学浸透説によればイオンの電気化学ポテンシャルは膜を介しての物質の輸送に利用され得る. 事実, 植物細胞に於て H^+ の電気化学ポテンシャルが糖やアミノ酸の輸送に利用されていることを示す実験結果が多く報告されつつある⁸⁻¹²⁾.

車軸藻類の節間細胞は直径数百 μm , 長さが 10cm 以上にも達する巨大細胞である. この利点を生かして切断, くくり, 遠心, 灌流等の細胞手術の手法が開発された. 特に細胞内を灌流すると細胞内の化学組成を任意に変えることができる. 植物細胞の大部分は大きい中央液胞で占められているために液胞灌流法¹³⁾によって細胞液が人工細胞液に置き換えられる. 灌流液に Ca^{2+} のキレート剤を加えると灌流後液胞膜がこわれる. このようにして調整した液胞膜除去細胞を用いると原形質の組成を任意に制御できる¹⁴⁾.

われわれに液胞膜除去細胞の利点を生かして起電性 H^+ ポンプの性質, および光による活性化の機構を明らかにした. さらに起電性イオンポンプによらない, 光によって活性化される別の起電機構 (おそらくは光による K^+ チャンネルの活性化) を見つけた.

2. 材料と方法

材 料

主として車軸藻類の一種オーストラリアシャジクモ (*Chara australis*, 以下 *Chara* と呼ぶ) を用いた. 野外に 60~90l のポリバケツを埋めて作った人工の池で培養を行った. また接合藻類の一種アオミドロ (*Spirogyra*) も用いた. これは 16 時間明 (2000 lux) 8 時間暗の光周期下で培養した.

車軸藻節間細胞の構造

Fig. 2a は車軸藻類節間細胞横断面の模式図である. 大きい膜系としては細胞壁, 原形質膜, 液胞膜がある. 原形質膜と液胞膜に囲まれた部分が原形質である. 原形質膜に接してうすいゲル状の原形質外質がありそれに一層の葉緑体が固着している. 葉緑体の内表面にはアクチンの繊維が細胞の縦方向に並んでいる. ゴル状の原形質にはミオシンが含まれており, アクチンとミオシンの相互作用によって内質が活発に流動している (原形質流動).

液胞膜除去細胞の調整 (Fig. 3)

アクリル樹脂で作った灌流台に 4 本の糸を置き, その上に節間細胞をのせる. 糸でゆるく結び目をつくった後, 細胞の両端を灌流液でおおう. 水が細胞の表面から蒸発して細胞の膨圧がなくなったところで細胞の両端をはさみで切る¹³⁾. 灌流台をかたむけることにより簡単に細胞内を灌流できる. 細胞液が完全に人工細胞液に置換されたところで灌流を止め, 外側の糸 (l_1, l_4) で細胞をくくる. 細胞を人工池水でおおひ膨圧を回復させたあと再び内側の糸 (l_2, l_3) で細胞をくくる. 外側と内側の糸の間で細胞を切るにより, 人工細胞液を持った細胞が調

Fig. 2 *Chara* 節間細胞の横断面図

cw: 細胞壁, pl: 原形質膜, tp: 液胞膜, vac: 液胞,
en: 内質, chl: 葉緑体, ec: 外質

Fig. 3 液胞灌流法

B: 灌流台, $l_1 \sim l_4$: テフロン糸, cell: 節間細胞,
 d_1, d_2 : 灌流液

整できる (Fig. 2b).

灌流後数分～数十分すると灌流液中の Ca^{2+} キレート剤のはたらきにより液胞膜が消失する。多くの内質はバラバラになって細胞内に散らばる。しかしながらいくつかの内質はアクチン繊維に結合しており、 $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ が存在する場合は活発に流動する (Fig. 2c)。この状態では細胞内の化学組成は原形質と灌流液の混ざったものである。液胞膜消失後もう1回灌流するとほとんど完全に細胞内の組成を制御できる (Fig. 2d)。

葉緑体の入れ換え (Fig. 4)

細胞を Ca^{2+} キレート剤を含む液で灌流したあと、細胞をくくって糸を利用して細胞を遠心管内につり下げる。7,000–20,000 $\times g$ で遠心するとすべての内質と葉緑体は遠心端に集まる。ここでくくりによって葉緑体を全く含まない細胞をつくることができる。他の細胞から分離した葉緑体を含む液で葉緑体除去細胞を灌流することにより、葉緑体についての雑種細胞を調製できる。

Fig. 4 *Chara* 節間細胞における葉緑体の入れ換え実験

膜電位の測定

ほとんどの場合は一般に用いられる微小電極法を用いた。外液には KCl , NaCl , CaCl_2 をそれぞれ 0.1mM 含む人工池水 (artificial pond water; APW) を用いた。

細胞内を灌流しながら膜電位を測定するために open-vacuole 法¹⁵⁾ を用いた。Fig. 5 に示すように3つのプールを持つアクリル製の装置を準備する。外側の2つの

プールは連通管でつながっている。外側のプールは灌流液で満たし、中央のプールはソルビトールを加えることによって灌流液と等張にした APW で満たす。細胞を3つのプールにわたして置き、外側のプール内で細胞の両端を切る。この状態では外側のプールは細胞内と等電位であるために、外側と内側のプール間の電位差を測定することにより、中央のプール中の細胞片の膜電位を測定できる。外側と内側のプール間に通電することにより、膜を介して電流を流して膜抵抗を測定したり、刺激できる。連通管のコックを閉じて外側のプール間に水圧差をつけることにより細胞内を灌流できる。両プールに異なった組成の灌流液を入れて交互に灌流の方向を変えることにより、細胞内の化学組成の変化に対する膜電位の応答を測定できる。また電位測定中に電流パルスを送りつけ、それに応答しての電位の変化量として膜抵抗を記録した。

Fig. 5 Open vacuole 法

A, B, C: プール, Cha: 節間細胞,
E, E: 電極, T: 連通管, K: コック

灌流液の組成 (Table 1)

液胞膜を除去するには通常 EGTA を用いる。EGTA は Ca^{2+} とは強く結合するが、 Mg^{2+} との結合は弱い。そのため細胞内において Mg^{2+} 依存性の化学反応を阻害しない。EDTA および CyDTA は Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の両者を強く結合するために、 Mg^{2+} 依存性の ATPase などを阻害する。ヘキソキナーゼとグルコースが存在すると、ATP は分解されて細胞内の ATP 濃度は $1\mu\text{M}$ 以下になる¹⁶⁾。

3. 結 果

3.1 $\text{Mg} \cdot \text{ATP}$ 依存の電位発生

3.1.1 Mg^{2+} -ATPase による膜電位の発生

Chara の原形質中の K^+ 濃度は 110mM なので¹⁷⁾、APW 中 ($0.1\text{mM } \text{K}^+$) での K^+ の平衡電位は -177mV となり、原形質膜を介しての平衡電位としてはすべてのイオン種のなかで最も負の値である。外液の pH を 8 にした場合、実測される膜電位が -280mV にも達することがあり (新免: 未発表)、イオンの拡散電位によっては説明できない。これは *Chara* に起電性イオンポンプが存在することを示唆している。EGTA-Mg 液で灌流してもその値は変わらない。これは液胞膜の除去後も起電性機構が維持されていることを示す。細胞体積の約 10% を占める原形質中には約 0.5mM (16) の ATP が含まれているために液胞膜消失後の細胞内 ATP 濃度は $50\mu\text{M}$ となる。これは起電性ポンプの活性が $50\mu\text{M}$ の ATP で飽和していることを示す。Slayman ら¹⁸⁾ はアカパンカビ (*Neurospora*) において起電性ポンプの ATP に

Table 1 灌流液の組成

	Perfusion medium				
	EGTA-Mg	EGTA-Mg-ATP	HK	EDTA	CyDTA-ATP
EGTA (mM)	5	5	5	0	0
EDTA (mM)	0	0	0	5	0
CyDTA (mM)	0	0	0	0	5
ATP (mM)	0	1	0	0	1
MgCl_2 (mM)	6	6	6	0	0
Hexokinase (mg/ml)	0	0	1	0	0
Glucose (mM)	0	0	5	0	0
Buffer (mM)	5 Tris-maleate or 30 PIPES	5 Tris-maleate or 30 PIPES	5 Tris-maleate	5 Tris-maleate	5 Tris-maleate
K^+ (mM)	17	21—27	17—67	20	25
Sorbitol (mM)	290	200—290	200—290	310	310
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

Fig. 6 細胞内 ATP 濃度の変化に対する *Chara* の膜電位の応答
細胞内 ATP を制御するために EGTA-Mg・ATP 液 (+) と EGTA-Mg 液 (-) で交互に灌流をくり返した。文献¹⁹⁾より

関する K_m 値が約 2mM であることを報告している。*Chara* とアカパンカビの起電性ポンプの ATP に対する親和性には大きい違いがあるようである。

HK 液で灌流した細胞では膜電位は -100mV に脱分極する。また EDTA 液、CyDTA-ATP 液で灌流して細胞内の Mg^{2+} 濃度を下げても同様に脱分極が起きる。これは *Chara* の膜電位が ATP と Mg^{2+} により維持されていることを示す¹⁹⁾。

open-vacuole 法で膜電位を測定し、A室を EGTA-Mg 液、C室を EGTA-Mg・ATP 液で満たす。最初細胞内には EGTA-Mg・ATP 液が含まれているために膜電位は大きい値を持つ (Fig. 6)。次に EGTA-Mg 液で灌流すると細胞内から ATP が洗い流されるために膜は急激に脱分極する。再び EGTA-Mg・ATP 液で灌流すると再分極が起きる。この ATP 濃度変化に対する膜電位の脱分極と再分極は30回以上繰り返すことができた¹⁹⁾。Fig. 6 からわかるように灌流時の膜電位の変化は非常に速い。これは ATP がなくなったために能動輸送が止まり細胞内のイオン濃度が変化した結果として拡散電位が変わったのではなく、ATP がより直接的に電位発生に関与していることを示す。すなわち、イオンの輸送過程そのものが電位発生の原因であることを示唆している。

EGTA-Mg・ATP 液と CyDTA-ATP 液で灌流を繰り返して細胞内の Mg^{2+} 濃度を変化させることによって膜電位を制御できる (Fig. 7)¹⁹⁾。

EGTA-Mg 液による灌流で脱分極させたあと ATP の代わりに AMP-PNP を含んだ液で灌流しても膜電位は回復しない。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^{20,21)}、*Chara* における膜電位の維持には ATP が分解されるこ

Fig. 7 細胞内 Mg^{2+} 濃度の変化に対する *Chara* 膜電位の応答

細胞内 Mg^{2+} 濃度を制御するために EGTA-Mg・ATP 液 (+) と CyDTA-ATP 液 (-) で交互に流通をくり返した。文献¹⁹⁾より。

とが必要であろうと推論できる¹⁹⁾。

以上の結果より、*Chara* の起電性イオンポンプは Mg^{2+} 依存性 ATPase 作用をもっているといえる。

3.1.2 ATP 依存性の H^+ 放出

アカパンカビを呼吸阻害剤で処理すると ATP 濃度が減少するために脱分極¹⁸⁾および H^+ 放出の阻害²²⁾ が起こる。車軸藻類でも H^+ の放出が報告されているが²³⁾、われわれは液胞膜除去細胞を用いて H^+ 放出が ATP に依存するかどうかをみた²⁴⁾。

Chara の節間細胞を HK 液または EGTA-Mg・ATP 液で灌流し約 30 分間少量の APW 中に置いた。 H^+ 放出量は以下の 2 つの方法で定量した。1) APW に pH 指示薬のフェノールレッドを加えておき H^+ 放出後、元の pH までアルカリで滴定する。2) APW に弱い緩衝液を加えておき H^+ 放出前後の pH を測り緩衝液の滴定曲線より H^+ 放出量を求める。予想に反して HK 液で灌流した細胞においても外液は酸性化し H^+ の正味のエフラックスは $1.9\text{pmoles/cm}^2/\text{sec}$ であった。この ATP 非依存性の外液酸性化は有機酸の流出によるのかも知れない。EGTA-Mg・ATP 液で灌流した細胞においては $5.8\text{pmoles/cm}^2/\text{sec}$ の H^+ 放出に相当する酸性化が起きた。両者の差 $3.9\text{pmoles/cm}^2/\text{sec}$ が ATP 依存性の H^+ 放出である。

以上、液胞膜除去細胞を用いた実験から車軸藻類における起電機構は Mg^{2+} -依存性 ATPase 作用をもつ H^+ 放出ポンプによることが示唆された。

3.1.3 ポンプ活性の細胞外 pH 依存性

H^+ ポンプの活性が高い細胞の膜電位は外液の pH

Fig. 8 Mg-ATP 細胞および HK 細胞の膜電位 (E_m) の外液 pH (pH_o) に対する応答
○ Mg-ATP 細胞 ● HK 細胞 ◐ E_a
文献 26) より改変

Fig. 9 Mg-ATP 細胞および HK 細胞の膜抵抗 (R_m) の外液 pH (pH_o) に対する応答
○ Mg-ATP 細胞, ● HK 細胞
文献 26) より改変

(pH_o) に強く依存する。しかし DNP などの呼吸阻害剤によって H^+ ポンプを阻害すると膜電位は pH_o に反応しなくなる^{2,25)}。われわれは阻害剤を使わず、ポンプのエネルギー源である ATP 濃度を下げて直接ポンプを止めておいて、膜電位の pH_o 依存性をみた²⁶⁾。

EGTA-Mg-ATP 液で灌流した細胞 (Mg-ATP 細胞) では正常細胞と同様に膜電位が pH_o に強く依存する (Fig. 8)。HK 液で灌流することによって H^+ ポンプを止めた細胞 (HK 細胞) では pH_o に対する膜電位の応

Fig. 10 ポンプ電流 (I_p) の外液 pH に対する応答
文献 26) より改変

答が小さい (Fig. 8)。HK 細胞の電位は E_a を示し、Mg-ATP 細胞と HK 細胞の電位の差が起電性ポンプにより発生する電位 (E_a) である。膜抵抗は細胞内から ATP を除去すると上昇する (Fig. 9)。 E_a と Mg-ATP 細胞の膜抵抗 ($1/g_a$) から (6) 式を用いて I_p を計算すると Fig. 10 に示すように pH 6.4—8.4 ではほぼ $5 \mu A/cm^2$ の一定の値をとり、pH 4.4 で小さくなる。

3.1.4 ポンプ活性の細胞内 pH 依存性²⁷⁾

液胞灌流法によって液胞膜除去細胞を調整する際に灌流液の pH を変えることにより細胞内 pH (pH_i) を変えることができる。Mg-ATP 細胞では pH_i が 6~7 で膜電位が最も大きい。HK 細胞ではアルカリ側で少し大きくなる (Fig. 11a)。 E_a も pH_i 6~7 で最も大きい。膜抵抗は Mg-ATP 細胞、HK 細胞ともに酸性側で大きい (Fig. 11b)。これは酸性側において膜のイオン透過性が低いことを意味する。(6) 式を用いて I_p を計算すると Fig. 12 に示すように中性付近で最も大きい。これはアカパンカビの原形質膜小胞で測定された H^+ ポンプと思われる ATPase 活性の pH 依存性とほぼ一致する^{28,29)}。

3.1.5 起電性 H^+ ポンプの光による活性化

Nagai と Tazawa⁶⁾ は微小電極法を用いて車軸藻類の一種ヒメフラスモ (*Nitella flexilis*) の膜電位が光照射によって過分極方向に変化することを見つけた。Fig. 13 に *Chara* の光電位反応 (LPC: light-induced potential change) を示す¹⁶⁾。光照射によって膜電位はゆっくりと過分極して一定の値に落ちつき、光を消すと再び元の値にもどる。暗中に比べて光照射時の方が膜電位の外液に対する反応性が大きいこと⁴⁾、光照射によって H^+ 放出

Fig. 11 Mg-ATP 細胞および HK 細胞の膜電位 (E_m) 膜抵抗 (R_m) および起電性ポンプにより発生する電位 (E_a) の細胞内 pH (pH_i) に対する応答
○: Mg-ATP 細胞, ●: HK 細胞, ●: E_a
文献 27) より

Fig. 12 ポンプ電流 (I_p) の細胞内 pH (pH_i) に対する応答
文献 27) より改変

が活性化されること²³⁾などから、光によって起電性 H^+ ポンプが活性化されることにより LPC が起きるものと予想される。HK 細胞では LPC が起きないという事実¹⁶⁾ もこれを支持する。すなわち H^+ ポンプを駆動する ATP がなくなると H^+ ポンプが活性化されようがなくなる。

LPC の光波長依存性^{6,30,31)}と光合成の阻害剤 DCMU によって完全に阻害されること⁴⁾ などから光合成が関与していることが示唆される。緑藻の一種アオミドロ (*Spirogyra*) も同様な LPC を示すが Fujii ら³²⁾によって

Fig. 13 液胞膜を除去された *Chara braunii* にみられた光電位反応
D: 暗, L: 明
文献 16) より

LPC に葉緑体が関与していることが直接的に証明された。アオミドロは円柱形の細胞が縦方向に一つにつながった糸状の植物体で、細胞内には 1 個の核と 1~数本の細長い板状の葉緑体がある (*Spirogyra*) の通りらせんを巻いて入っている。この実験では 1 本の葉緑体を持つアオミドロを用いた。細胞分裂直前の細胞を縦方向に速くすると核と葉緑体は速く端に集まる。このような処理によっても細胞分裂にともない隔壁が形成されるので核も葉緑体も含まない娘細胞と、2つの核と葉緑体を持つ娘細胞ができる (Fig. 14a)。LPC は後者においてのみ起きる。また細胞分裂の結果葉緑体の一部分だけ求心側の娘細胞に移る場合があるが、このような細胞では LPC が起きる (Fig. 14b)。このように光合成時に葉緑体内で何らの「情報」がつくられ、それが原形質膜の H^+ ポンプを活性化するものと思われる。

ではその情報とは何であろうか。最も考えやすいのは光照射によって H^+ ポンプの基質である H^+ または ATP の原形質中の濃度が上昇することである。*Chara* の原形質の pH は暗の中では 7.4 で光照射により 7.7 に変化することが報告されている³³⁾。しかしながら、Fig. 11a に示した膜電位の pH_i 依存性から判断すると、 pH_i 変化による Fig. 13 のような大きい膜電位の変化は期待できない。また液胞膜除去細胞を用いて細胞内 pH を大きく変えても、LPC が起きる事実も、 H^+ 濃度変化が LPC の原因であることを否定する²⁷⁾。はじめに述べたように H^+ ポンプの活性は $50\mu M$ の ATP 濃度で飽和しており、一方原形質内の ATP 濃度は $500\mu M$ であること¹⁶⁾ から ATP 濃度変化が LPC の原因であるという考えは否定される。また $5mM$ の ATP を含む液で細胞を灌流しても LPC が起きること¹⁶⁾、ATP 濃度変化説を否定する。では何が葉緑体から原形質膜に伝えられて H^+ ポンプが活性化されるのであろう。アオミドロでは DCMU で電子伝達を止めると光電位反応が起きないが、同時に PMS を加えて循環的

Fig. 14 速心したアオミドロ細胞における光電位反応
文献 32) より

電子伝達を行わせると光電位反応が回復することから³²⁾ 電子伝達系が働くことが情報発生の原因になっていることがわかる。しかし *Chara* と同じ車軸藻類の一種ヒメフラスモでは循環的電子伝達の促進剤により LPC が阻害されること、光化学系IIを励起しない波長 700nm 以上の光では LPC は起こらないことから非循環的電子伝達が不可欠であるといわれている³⁴⁾。

3.1.6 膜興奮と起電性 H^+ ポンプ

膜興奮性を持つ植物のうち車軸藻類は最も研究が進んでいるものである。イカの巨大神経では膜の Na^+ 透過性が一時的に上昇することが活動電位における脱分極の原因である³⁵⁾。車軸藻類では Cl^- 透過性の上昇が脱分極の原因であろうと一般に考えられている。しかしながらこれまでに見てきたように車軸藻類の膜電位は拡散電位 (E_d) と起電性ポンプにより発生する電位 (E_a) から成っているので活動電位における膜電位変化は単に膜の受動的透過性の変化のみによって解釈することはできない。そこで open vacuole 法を用いて活動電位のピーク

Fig. 15 活動電位のピーク時における E_a の測定
膜電位 (V_m) を open vacuole 法で測定し細胞内を EGTA-Mg-ATP 液と EGTA-Mg 液で交互に灌流した (原図)。 I_m は電流記録。a-f については本文参照。

Fig. 16 膜興奮時における拡散電位 (E_d) および起電性ポンプにより発生する電位 (E_a) の変化
外液には 2mM K_2SO_4 が加えてある (原図)

時の電位は上の二つの電位成分からどのように構成されているかをみた³⁶⁾。この実験ではそれぞれ 17mM と 21mM の K^+ を含む EGTA-Mg 液と EGTA-Mg-

Fig. 17 HK 細胞にみられる速い光電位反応 外液には常に $10\mu\text{M}$ の中性赤が加えてある。pH₀ を 5.7 から 8.0 へと変えた。(原図)

ATP 液を用いた。細胞内の K^+ 濃度を低くすると活動電位の持続時間が長くなる³⁷⁾。先ず EGTA-Mg-ATP 液で灌流してあるために膜電位は大きい (Fig. 15)。ここで外向き電流で活動電位を発生させると細胞内 K^+ 濃度が低いために膜は興奮状態を持続し膜電位は脱分極レベルに止っている (a)。次に EGTA-Mg 液で灌流を始めたところで活動電位が終り膜電位は静止電位にもどり始めた (b)。しかしながら EGTA-Mg 液の灌流で細胞内から ATP が除去されたため再び脱分極が始まり、閾値に達したところで興奮による急激な脱分極が起きる (c)。この結果落ち着いた電位は起電性ポンプによる成分を含まない (d)。EGTA-Mg-ATP 液で灌流すると小さな過分極が起きる (e)。この変化分が興奮時に起電性ポンプにより発生する電位 (E_a) である。興奮時の E_a は $8.7 \pm 1.6\text{mV}$ ($n=7$) である。次に内向き電流を流すことによって静止電位にもどる (f)。

静止状態および興奮状態における膜電位の構成を図で示してみよう (Fig. 16)。この実験において外液には 4mM の K^+ が加えてあるために EGTA-Mg 液で 1 回灌流した細胞の静止電位は -144mV である。HK 液で灌流した細胞の静止電位は -50mV である。Fig. 1 のモデルでいうと静止時の E_a は -50mV で E_a は -94mV となる。EGTA-Mg 液で一回灌流した細胞の活動電位のピーク電位は -33mV である。これは E_a と E_a より成る値である。ところで静止時と興奮時の膜抵抗は $32\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ と $2\text{k}\Omega\cdot\text{cm}$ で、興奮時に膜抵抗は $1/16$ に減少する¹⁹⁾。興奮時に I_p が変わらなると仮定すると (5) 式より興奮時に E_a が $1/6$ 、すなわち 5.6mV になると予想される。この値は Fig. 15 におい

て実験的に測定した興奮時の E_a 値とほぼ一致する。また興奮時の E_a は (4) 式より -27mV となる。このように興奮により E_a は -50mV から -27mV 、 E_a は -94mV から -5.6mV へと変化しており、膜電位変化としては E_a の貢献が大きいことがわかる。細胞内の ATP を除去したり³⁶⁾、阻害剤処理によって³⁸⁾ ポンプを止めた場合にのみ、神経のように純粋に拡散電位よりなる活動電位が発生する。

3.2 Mg-ATP 非依存の電位発生

2.2.1 速い光電位反応

先に述べたように *Chara* の細胞内から ATP を除くと H^+ ポンプの活性化による光電位反応は起きなくなる¹⁶⁾。しかし細胞を生体染色に用いる中性赤で染めると別の光電位反応が起きるようになる (Fig. 17)³⁹⁾。外液は少しアルカリ (pH 8 程度) の方が反応が大きい。この光電位反応は H^+ ポンプの活性化によるものと比べて非常に速い (Fig. 13 参照)。以後この光電位反応を rLPC (rapid light-induced potential change) と呼ぶ。作用スペクトルは中性赤の吸収スペクトルとは異なり、Fig. 18 に示すように光合成の作用スペクトルとはほぼ一致する。また光合成の阻害剤である DCMU によって阻害されることから rLPC も光合成が関与していることが示唆される³⁹⁾。まれ葉緑体が関与していることは葉緑体の入れ換え実験により直接的に示された⁴⁰⁾。HK 液で細胞を灌流した後 $7,000\sim 12,000\times g$ で $5\sim 10$ 分遠心することにより葉緑体を除去しても膜電位は影響されない。灌流液に Mg-ATP が含まれている場合には葉緑体除去後も膜興奮性は維持される⁴¹⁾。葉緑体除去細胞では rLPC は起きない。別の *Chara* 細胞を HK 液で

Fig. 18 速い光電位反応の作用スペクトル
文献 39) より

Fig. 19 別の *Chara* 細胞から分離した葉緑体を持つ HK 細胞が示す速い光電位反応 (Fig. 4 参照)
外液は $10\mu\text{M}$ 中性赤を含んだ pH 8 の APW (原図)

灌流したあと指でしぼり出した葉緑体の懸濁液で葉緑体除去細胞を灌流すると rLPC が起きようになる (Fig. 19). このことは葉緑体がゲル層に付着していることは rLPC の誘導に必ずしも必要ではないことを意味する. ホウレンソウから分離した葉緑体でも rLPC を起こすことができる⁴⁰⁾. すなわち光合成時に葉緑体でつくられて原形質膜で rLPC を起こす情報は種特異的なものではないといえる. ホウレンソウから分離した葉緑体を蒸留水処理して包膜をこわすと炭素固定能は失われる. このような葉緑体でも rLPC を引き起こすことができるので炭素固定反応は必要ではない. このように天然の Hill 酸化剤としての CO_2 の還元がなくても rLPC が起きること, 浸透的にこわれた葉緑体では見かけ上酸素発生が見られないこと, また DCMU により完全に阻害

Fig. 20 メーラー反応 (文献 43) より
Ps1: 光化学系 1, Ps2 光化学系 2

Fig. 21 HK 細胞の明中 (i) および暗 (d) における膜電位 (E_m) および膜抵抗 (R_m) の外液 K^+ 濃度 ($[\text{K}^+]_o$) に対する応答 (文献 39) より)

E_k の値も同時に示してある. 外液は $10\mu\text{M}$ の中性赤を含んだ pH 8 の APW.

されることから, 酸素自身が電子受容体となる Mehler 反応^{42,43)} による偽循環的電子伝達が rLPC を支えている可能性がある (Fig. 20). いずれにしろ電子伝達反応においてある種の「情報」がつくられるものと思われる.

3.2.2 光による K^+ チャンネルの活性化

rLPC には H^+ ポンプが関与していないとすれば, どのような機構で光照射時に過分極が起こるのであろうか. 光電位反応時に膜電位は K^+ の平衡電位に近づくので (Fig. 21)³⁹⁾, rLPC において K^+ チャンネルが活性化されることが予想される. 光照射によって膜抵抗が減少する事実もこれを支持する (Fig. 21). 神経において K^+ チャンネルの阻害剤として知られている TEA は rLPC を可逆的に阻害する (Fig. 22). また TEA の類似体である C_9 も rLPC を阻害する⁴⁴⁾. これらの阻害剤は細胞外から与えても細胞内から処理しても有効である. Mg^{2+} のキレーターである CyDTA を含む液で灌流した細胞でも rLPC が起きる³⁹⁾. ATP または Mg^{2+} を除去すると H^+ ポンプの停止に伴い脱分極が起きるが,

Fig. 22 外液の TEA による rLPC の可逆的阻害, 外液は $10\mu\text{M}$ の中性赤を含む pH 8 の APW (文献 44) より
(a): 処理前 (b): 5mM TEA (c): TEA 除去後

はたして rLPC が起きる条件は何であろうか. 1979 年の秋に培養バケツから採集して温室で保存しておいた *Chara* では理由がわからないが $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ を含む液で灌流しても一時的に起電性ポンプが停止して脱分極した. このような細胞では rLPC が起きるので ATP と Mg^{2+} は rLPC の発生に直接には関与していないといえる.

H^+ ポンプが働いているために膜電位の大きい細胞でも外向き電流を流すことによって脱分極させると rLPC が起きる (Fig. 23)⁴⁵⁾. 暗と明中の電圧-電流曲線は Fig. 24 のようになる. この実験に使用した細胞では灌流後興奮性が失われるためにいわゆる N 字型特性はみられない. この図に示した細胞では H^+ ポンプの活性化による遅い光電位反応は起きなかった. 通電下において測定される膜電位差 (V_m) と膜電起力 (E_m) には次式の関係が成立する.

$$V_m = E_m + i_m R_m \quad (8)$$

i_m は膜電流を示す. (8) 式を用いて rLPC における E_m を求めると Fig. 24 のようになる. V_m は常に負の方向に変化するが, E_m は暗中の E_m がある値よりも負の場合は正の方向に変化し, 正の場合は負の方向に変化する. すなわち逆転電位が存在する. 逆転電位は E_K と一致する場合と一致しない場合がある. これは膜電位に起電性ポンプによる成分が含まれていることに原因するものと思われる. 正常細胞においても中性赤で染色後, 電流によって脱分極させると rLPC が起きようになる. このようになんらかの理由によって膜が脱分極すると rLPC が起きようになる. すなわち脱分極下においては, K^+ チャンネルが光合成時に発生する情報によって活性化されるような機構が存在するものと思われる.

4. 考 察

起電性イオンポンプが H^+ 放出ポンプであることが,

Fig. 23 $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ 細胞にみられる膜電位依存性の rLPC (文献 45) より
通電によって脱分極させた状態で rLPC を起こした. 外液は $10\mu\text{M}$ 中性赤を含む pH 8 の APW

Fig. 24 Fig. 23 に示したデータの電圧 (V_m) 電流 (I_m) 曲線 (● 暗中, ○ 明中) と (8) 式により計算された膜起電力 (E_m , ■ 暗中, □ 明中) (文献 45) より
光照射による (E_m) の変化の方向を矢印で示してある.

膜電位と H^+ 放出の両者が ATP 依存性であることより示唆されたが, まだしかと断定できない. 例えば電気的測定より計算されたポンプ電流 ($4\mu\text{A}/\text{cm}^2$: Fig. 10 $\text{pH}_0=6.4$, $2.5\mu\text{A}/\text{cm}^2$: Fig. 12 $\text{pH}_1=6.9$) が H^+ のみによって運ばれたとすると, 実験的に求めた ATP 依存性の正味の H^+ フラックス ($3.9\text{ pmoles}/\text{cm}^2/\text{sec} = 0.36\mu\text{A}/\text{cm}^2$) はその一部分を満たしているにすぎない. これは H^+ の受動的インフラックスあるいは OH^- の受動的なエフラックスが, ポンプによる H^+ のエフラックスを打ち消していることによるのかも知れない. また H^+ ポンプの他に他の未知の起電性イオンポンプが働いているのかも知れない.

植物の原生質膜 H^+ -ATPase の生化学的知見はアカパンカビの膜小胞による研究があるだけである²⁹⁾。この小胞の $[^{14}C]$ SCN⁻ の取り込みで見た電位発生と ATPase 活性とはよく平行している²⁸⁾。また ATPase 活性の至適 pH は 6.7 であり²⁹⁾, *Chara* の H^+ ポンプの至適 pH 6.9 (Fig. 12) によく一致している。しかしながら ATPase の ATP に対する親和性には両者の H^+ ポンプ間に大きな差がある。既に述べたようにアカパンカビの H^+ ポンプの ATP に対する K_m は 2mM¹⁸⁾ であるのに比べて *Chara* のそれは 50 μ M 以下である¹⁶⁾。

植物の起電性イオンポンプは光により活性化される。しかもその活性化は光合成を介して行われる。多くの研究者は光リン酸化による ATP 合成が原因と考えた。事実、水生高等植物の一種カナダモ (*Elodea*) の葉の葉緑体と細胞質中の ATP レベルは光照射により急速に上昇する⁴⁶⁾。ラン藻の一種 *Anacystis* でも同様の報告がある⁴⁷⁾。しかし一方大麦の葉では通常の条件 (空气中) 下では ATP レベルは明暗により変動しないという報告もある⁴⁸⁾。車軸藻類の一種ミルフランスモ (*Nitella axilliformis*) でも明暗により ATP レベルは影響されない⁴⁹⁾。また本文で述べたように ATP を既に過剰に与えても光による電位発生が見られることなどから光は単に ATP 合成を介してのみでなく、電子伝達を介してなんらかの制御をポンプにおよぼしている可能性がある。光電位反応が遅い (10~20分) 時間経過でおこることから、なんらかの「物質情報」が細胞質に蓄積することよりポンプの活性化が促されるものと思われる。最近、われわれは光合成だけでなく、細胞の呼吸活性が膜電位と密接に関連している証拠を得ている⁴⁹⁾。高等植物ではキンギョソウの葉⁵⁰⁾ やササゲの胚軸^{51~53)} の膜電位が無酸素状態で急速に脱分極することが知られている。車軸藻類の一種ホシツリモ (*Nitellopsis*) では膜電位は細胞内灌流法により十分 ATP を入れておいても種々の呼吸阻害剤で脱分極する。また、正常の細胞を無酸素状態にすると ATP を除いたと同じレベルにまで膜電位は低下する。このとき ATP レベルは影響を受けていない⁴⁹⁾。このように植物細胞膜にある起電性イオンポンプ活性は基質としての ATP, H^+ により一次的に影響を受けるだけでなく、明暗いずれの条件下でも葉緑体、ミトコンドリアといった重要な細胞器官の代謝活性により微妙な制御を受けていることがわかる。

中性赤で染めた細胞に見られる光依存性の起電性機構はポンプ機構とは全く別の K^+ チャンネルの活性化によることが明らかとなったが、両機構の制御に共に光合

成の電子伝達系が関与していることは興味深い。

Abbreviations

AMP-PNP; adenylyl imidodiphosphoric acid
ATP; adenosine-5'-triphosphoric acid
C₉; nonyltriethylammonium
CyDTA; 1,2-cyclohexane diamine-*N*, *N'*-tetraacetic acid
DCMU; 3-(3', 4'-dichlorophenyl)-1, 1'-dimethylurea
DNP; 2,4-dinitrophenol
EDTA; ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA; ethyleneglycol-bis-(β -aminoethylether) *N*, *N'*-tetraacetic acid
HK; hexokinase
PMS; phenazine methosulfate
TEA; tetraethylammonium

文 献

- 1) D. Gradmann, G. Wagner, R.M. Glasel: *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 151 (1973)
- 2) H. Kitasato: *J. Gen. Physiol.*, **52**, 60 (1968)
- 3) R. M. Spanswick: *Biochim. Biophys. Acta*, **288**, 73 (1972)
- 4) K. Saito, M. Senda: *Plant & Cell Physiol.*, **14**, 1045 (1973)
- 5) K. Saito, M. Senda: *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 1007 (1973)
- 6) R. Nagai, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, **3**, 323 (1962)
- 7) A. B. Hope: *Aust. J. Biol.*, **18**, 789 (1965)
- 8) E. Komor, W. Tanner: *Eur. J. Biochem.*, **44**, 219 (1974)
- 9) B. Etherton, B. Rubinstein: *Plant Physiol.*, **61**, 933 (1978)
- 10) A. Novacky, C.I. Ullrich-Eberius, U. Lüttge: *Planta*, **138**, 263 (1978)
- 11) V. M. Hutchings: *Planta*, **138**, 229 (1978)
- 12) H. Felle, F. W. Bentrup: *Planta*, **147**, 471 (1980)
- 13) M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, **5**, 33 (1964)
- 14) M. Tazawa, M. Kikuyama, T. Shimmen: *Cell Structure & Function*, **1**, 167 (1976)
- 15) M. Tazawa, M. Kikuyama, S. Nakagawa: *Plant & Cell Physiol.*, **16**, 611 (1975)
- 16) M. Kikuyama, S. Fujii, T. Hayama, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, **20**, 993 (1979)
- 17) M. Tazawa, U. Kishimoto, M. Kikuyama: *Plant & Cell Physiol.*, **15**, 103 (1974)
- 18) C. L. Slayman, W. S. Long, C. Y. -H. Lu: *J. Membrane Biol.*, **14**, 305 (1973)
- 19) T. Shimmen, M. Tazawa: *J. Membrane Biol.*, **37**, 167 (1977)
- 20) R. L. Melnick, J. Tavares de Saousa, J. Maguire, L. Packer: *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 139 (1975)

- 21) R. G. Yount, D. Ojala, D. Babcock: *Biochemistry*, **10**, 2490 (1971)
- 22) G. L. Slayman: *Am. Zool.*, **10**, 377 (1970)
- 23) D. J. Spear, J. K. Barr, C. E. Barr: *J. Gen. Physiol.*, **54**, 397 (1969)
- 24) T. Shimmen, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.* (in press)
- 25) J. L. Richard, A. B. Hope: *J. Membrane Biol.*, **16**, 121 (1974)
- 26) G. Kawamura, T. Shimmen, M. Tazawa: *Planta*, **149**, 213 (1980)
- 27) S. Fujii, T. Shimmen, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, **20**, 1315 (1979)
- 28) G. A. Scarborough: *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 384 (1977)
- 29) B. J. Bowman, C. W. Slayman: *J. Biol. Chem.*, **254**, 2928 (1979)
- 30) Y. Nishizaki: *Sci. Rep. RITU.*, D11, 9 (1960)
- 31) C. Shilde: *Planta*, **71**, 184 (1966)
- 32) S. Fujii, T. Shimmen, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, **19**, 573 (1978)
- 33) N. A. Walker, F. A. Smith: *Plant Science Letters*, **4**, 125 (1975)
- 34) G. A. Volkov: *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 83 (1973)
- 35) A. L. Hodgkin, A. F. Huxley: *J. Physiol.*, **116**, 449 (1952)
- 36) M. Tazawa, T. Shimmen: "Plant Membrane Transport: Current Conceptual Issues" (ed. by R. M. Spanswick, W. J. Lucas, J. Dainty) pp. 349-362, North-Holland Biomedical Press (1980)
- 37) T. Shimmen, M. Tazawa: *J. Membrane Biol.*, **30**, 249 (1976)
- 38) U. Kishimoto, N. Kami-ike, Y. Takeuchi: *J. Membrane Biol.*, **54**, 149 (1980)
- 39) G. Kawamura, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 547 (1980)
- 40) M. Tazawa, T. Shimmen: *Plant & Cell Physiol.*, **21** 1527 (1980)
- 41) M. Tazawa, T. Shimmen: "Electrogenic Ion Pumps" (ed. L. Slayman) Academic Press, New York (1981)
- 42) A. H. Mehler: *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 65 (1951)
- 43) S. M. Glidewell, J. A. Raven: *J. Exptl. Bot.*, **26**, 479 (1975)
- 44) M. Tazawa, T. Shimmen: *Plant & Cell Physiol.*, **21**, 1535 (1980)
- 45) T. Shimmen, M. Tazawa: *Plant & Cell Physiol.*, (in press)
- 46) O. Heber, K. A. Santarius: *Z. Naturforsch.*, **25b**, 718 (1970)
- 47) T. Bonefeld, W. Simonis: *Planta (Berl.)*, **115**, 309 (1974)
- 48) U. Lüttge, E. Ball: *Z. Pflanzenphys.*, **80**, 50 (1976)
- 49) 三村徹郎, 新免輝男, 田沢 仁: 日本植物学会, 第45回大会研究発表記録, 230 (1980)
- 50) H. Okamoto: *Plant & Cell Physiol.*, **17**, 1273 (1976)
- 51) K. Ichino, K. Katou, H. Okamoto: *Plant & Cell Physiol.*, **14**, 127 (1973)
- 52) A. Mizuno: *Plant & Cell Physiol.*, **19**, 1315 (1978)
- 53) K. Katou: *Plant & Cell Physiol.*, **19**, 523 (1978)

巨大粒子のゲルパーミエーションクロマトグラフィ——生体粒子の粒径分離

星 猛・堀尾武一監修 大沢一爽・田中善喜編集

1980, 400 ページ 定価11,000円, 喜多見書房, 東京

ゲルパーミエーションクロマトグラフィ (GPC) による分子の単離・精製技術の進歩は目覚ましいが、これまでは主に径が200Å以下のものを取扱って来た。しかし最近では、生体粒子のように数百Å以上のものにも適用できる分離法の確立が叫ばれており、その有力な方法の一つとして、一般の GPC に比し分離過程が穏やかで、粒子に剪断力などがからないという長所をもつ多孔性ガラスビーズカラムを用いる手法があげられる。本書は、この多孔性ガラスビーズカラムによる数百～数千Åの巨大粒子の分離法の原理・手法および各種生体粒子分離への応用をまとめたものである。

全体としては基礎編(1～4章)、応用編(5～16章)および続応用編(17～18章)からなっている。基礎編では多孔性ガラスビーズの製法、カラムの分離機構、多孔性ガラスの表面構造、変性剤存在下でのタンパク質の GPC が詳細に述べられている。応用編の各章では、タンパク質の高速 GPC、クロマチンの単離、ウシ由来ウイルス精製神経大型シナプス小胞や小腸刷子縁膜小胞、腎皮質刷子縁膜小胞の単離、ウロキナーゼの精製、アイソエン

ザイムの分離、タンパクの吸着クロマトグラフィ、ヒトデ卵ゼリー物質の GPC 分画、酵素の固定化および分析化学・臨床検査への応用が述べられている。続応用編では低角レーザー光散乱光度計の GPC への応用、混入大粒子の検出法、また付録として分画分子数の測定法などが紹介されている。これからわかるように基礎から応用まで非常に情報量の多い書であり、その内容は各章とも第一人者が執筆され充実している。ただ、それぞれの章が充実しているあまりに各章間の関係がうまくとれていないようで二、三の章の間は記述に重複がみられる。また書名とはいささかかけはなれた話題についての記述もないわけではない。しかしコンピュータシミュレーションを駆使した分離機構の理論や、付録の部分のように編者自身の手になる章では、他書に見られないような意欲的な試みがなされている。理論から最新の応用例まで、網羅しているという点では GPC の入門者はもちろん、GPC を日々取り扱っている研究者にとっても一読を勧めたい好著といえよう。

(京都大学工学部 北野博己・伊勢典夫)