生体膜におけるプロトンと電子の移動*

曾 根 勇 史**

はじめに

この10年の間に生化学の分野で、2つの大きな原理が確立した。1つは流動モザイク説で、生体膜の構造はリン脂質2分子膜中に膜タンパク質が浮んだものとするモデルである¹⁾。他の1つは、P. Mitchell 提唱の化学浸透圧説で、ある種の生体膜において、エネルギーは H^+ の電気化学的勾配 ($\Delta\mu H^+$) の形で保存されるという主張である²⁾。これは1966年(原型は1961年)に発表されてから、数多くの議論をひきおこし、約10年後に広く認められるようになった。生体内のエネルギー獲得反応である酸化的リン酸化(あるいは光リン酸化)反応とは、電子伝達反応(光依存性電子伝達反応)によって電子や H^+ が膜を横切って移動し、 $\Delta\mu H^+$ を形成し、次いで H^+ -ATP 合成酵素 ($F_0 \cdot F_1$ または H^+ -ATPase ともいう) が、この $\Delta\mu H^+$ を利用して ADP と P_i から ATP を作るというものである。Fig. 1 は H^+ が、この2つの性質の異なる膜酵素によって触媒される反応を共役していることを示している。このように生体膜が閉じており、 H^+ に対して透過性が低いことが前提となるが、リン脂質2分子層はそのような性質をもっている。実験的な技術としては、生体膜の再構成、すなわち、精製した(あ

Fig. 1 酸化還元反応 (A) と ATP 合成反応 (B) の H^+ の動きを介する共役

Fig. 2 リボソームによる H^+ 輸送性酸化還元反応のモデル

Fc: ジブチルフェロセン, QH_2 : ヒドロキノン, PMSH: N-メチルフェナジニウムメチルサルフェート, Nig: ナイジェリシン, CCCP: カルボニルシアニド *m*-クロロフェニルヒドラゾン [P. C. Hinkle: *Fed. Proc.*, 32, 1988 (1973)]

るいは非精製の)膜タンパク質をリン脂質小胞(リボソーム)に組みこませ、再構成小胞を作る技術が重要である。膜タンパク質をリン脂質と共に透析可能な界面活性剤(胆汁酸)に可溶化しておき、界面活性剤を透析で除く透析法、稀釈する稀釈法、膜タンパク質をリン脂質と共に音波処理する方法や、あるいは凍結させ、タンパク質をリン脂質層に押し込んでおき後で軽く音波をかけ小胞化する凍結融解法が良く使われる方法である^{3,4)}。

1. 膜を横切る移動

生体膜においてどのようにプロトンと電子の移動が起こるかは、単なる衝突を想定するだけで説明できない。膜中を熱運動しつつある膜タンパク質ともう一つのタンパク質が衝突し、それぞれのタンパク質に固定された活性中心同志において酸化還元反応が起こることでは膜を横切った電子の移動は起こらず、 $\Delta\mu H^+$ も形成されない。 $\Delta\mu H^+$ の形成のためには、酸化還元反応に際して、膜を横切る H^+ と電子の移動が起こる必要があるが、

* Movement of Protons and Electrons across Biomembranes

本論文は、昭和56年5月15日、日本膜学会第3回年会で行われたシンポジウムを基にしたものである。

** Nobuhito Sone: 自治医科大学学生化学教室 (329-04 栃木県南河内町)

Table 1 アスコルビン酸によるリボソーム内のフェリシアン化カリの還元

膜透過性の酸化還元色素	還元速度, nmoles/min/mg				
	色素のみ	CCCP	バリノマイシン	ニジェリシン	バリノマイシン +ニジェリシン
ジブチルフェロセン	6.5	55	50	7.5	60
ヒドロキノン	23	22	20	65	70
PMS	4	34	27	4	85

Table 2 呼吸鎖の複合体

複合体	酵素活性 (還元剤→酸化剤)	実測粒子量 ($\times 10^3$)	最小分子量 ($\times 10^3$)	最小分子量当り の活性中心数	サブユニット数
I	NADH→Q	720	≈ 800 (FMN)	FMN 1, $n\text{Fe}$ 16 $\sim$ 20, $\sim S$ 16 $\sim$ 20	15
II	コハク酸→Q	200	200 (FAD)	FAD-His 1, $n\text{Fe}$ 8, $\sim S$ 8, $\text{ヘム } b$ 1	4
III	QH_2 →チトクロム c	262 $\sim$ 288	268 (c_1)	$\text{ヘム } b$ 2, $\text{ヘム } c_1$ 1, $n\text{Fe}$ 3, $\sim S$ 2	7
IV	チトクロム c → O_2	200 $\sim$ 250	≈ 90 ($\text{ヘム } a$)	$\text{ヘム } a$ 1, Cu 1	6

$n\text{Fe}$ は非ヘム鉄, $\sim S$ は不安定硫黄を示す. これらは Fe-S 中心を形成している.

これには本質的に2つの機作が考えられる. 1つは可動担体 (mobile carrier) モデルで H^+ や e^- をくっつけて膜を横切ってゆく担体を想定するものである. Fig. 2 は Hinkle の行なったモデル実験⁵⁾ で, フェリシアンを封入したリボソームを作っておき, 外側にアスコルビン酸を加えると, そのままではリン脂質2分子膜にさえぎられて反応は起こらないが, 脂溶性の酸化還元色素を加えると反応が起こるようになる. 面白いことに, 色素が水素伝達体であるか, 電子伝達体であるかによって, 運ばれるものが e^- であるか $-\text{H}=e^-+\text{H}^+$ であるかが決ってくる. そして Table 1 に示すように, 結果として運ばれたものが H^+ であれば K^+/H^+ の変換担体であるナイジェライシンによって, e^- の場合は K^+ の単独担体であるバリノマイシン, H^+ と e^- の両方であればナイジェライシンとバリノマイシンの組合せによりフェリシアニドの還元速度が増すことがわかってきた.

Mitchell はすでに1966年, 酸化的リン酸化反応における $\Delta\mu\text{H}^+$ 形成の機作として下のようなループ説を唱えている. 可動担体である水素伝達体と電子伝達体が交互に存在しておれば Fig. 2 のような反応の結果として膜

Fig. 3 ミトコンドリア内膜成分の内外性, ローマ数字は呼吸鎖複合体の番号. c はチトクロム c を, Q はユビキノンを $\text{F}_0 \cdot \text{F}_1$ は H^+ -ATP 合成酵素を示す.

を横切る H^+ の移動が行われるというものである.

2. 呼吸鎖 (電子伝達系) の実体

結論をくだす前に, このような H^+ 輸送性の膜がどのようなものかをミトコンドリア内膜を例にとってもう少し述べよう (チココイド膜における光依存的電子伝達系については豊島の綜説 (本誌 pp. 137 $\sim$ 参照)). Fig. 3 は呼吸鎖 (電子伝達系) が, 主としてローマ数字で示す4つのタンパク質複合体からできており, NADH やコハ

Fig. 4 チトクローム酸化酵素のモデル (B. Chance が紹介したもの⁶⁾。ローマ字はサブユニットの番号

ク酸を C_2 で酸化して NAD^+ やフマル酸を作ること、そしてこの過程で H^+ の輸送が行われることを示している。Table 2 はこれらの複合体の性質をまとめたものであるが、分子量が数十万（すなわちこの単位でリン脂質 2 分子膜中に存在）で、数～数十個のポリペプチドサブユニットからなり、そこに種々の活性中心が配置されていることを示している。これらの活性中心については、水素伝達体である $NADH$ 、フラビン (FAD および FMN) およびユビキノ (Q) と電子伝達体である鉄硫黄中心、銅および各種ヘムの区別が重要である。

これらの実体を考えると、可動担体（キャリアー）を想定するループ説では説明がやや苦しい。すなわち、脂溶性の低分子化合物であるユビキノ以外のものはタンパク質の特定の部位に強固に結合しているもので、これが膜と横切って移動する。あるいはタンパク質自体が回転して内外性 (sidedness) を変えるということは熱力学的にみてかなり困難である。すなわち、呼吸鎖におけるもう 1 つの $\Delta\mu H^+$ 形成の機構として、酸化還元反応は表面で起こってもよいが、膜を貫くタンパク質の中に H^+ を通過を可能にする機構 (H^+ チャンネル) が組合されているという考えが必要となる。イオノフォアにおいてもバリノマイシン、ナイジェライシンのようなキャリアー型のものとグラミシジンのようなチャンネル型のものの区別があるのと同様 H^+ 輸送の機作にも 2 種類あり、膜タンパク質によって行われる後者の場合、キャリアー型の機作はむしろ考えにくいということなる。次に何個か

の例を具体的に見てゆこう。

3. 酸化酵素とチトクローム c

複合体IVすなわちチトクローム酸化酵素については Fig. 4 のようなモデルが提案されている。チトクローム c から活性中心にある a , a_3 , Cua , Cua_3 に電子が移動するわけであるが、約 $30 \text{ \AA}$ の距離がある。

一方チトクローム c の分子内でどのように電子伝達が起こるか、ある程度の推測がされている⁷⁾。すなわちヘム c は分子のポケットに存在しており、外部に面した Arg 38 から分子内の水素結合を通してヘム c に電子が流れこむというものである (Fig. 5)。酸化される場合にも同様のアミノ酸残基を介する電子の流れがあると考えられている。これらは electron tunneling と呼ばれている。

Fig. 5 チトクローム c 分子内部の水素結合網 (文献⁷⁾ より)

4. バクテリオロドプシン

H^+ の輸送については、研究に好都合な光依存性の H^+ ポンプが知られている。好塩菌に存在するバクテリオロドプシンは、目の感光タンパク質であるロドプシンと同じく、レチナール（視紅素）を含む分子量 26,000 のタンパク質で安定で精製も簡単なので、多くの研究が行なわれている。このアミノ酸配列も決定されており、7 本の α -ヘリックスを形成して膜を横切っていること、膜内にも Tyr, Trp, Lys 等の残基が存在すること、レチナールはおそらく Lys⁴⁰ にくっついており、そのとなりに Lys⁴¹ のあることが知られている。機能としては、一光子の吸

は好熱菌のもので、2回目(N端から)の膜内 α -ヘリックス部に Arg, Glu, Tyr といった解離可能な残基があることが注目される。また分子に1個しかない Tyr をテトラニトロメタンで化学修飾すると約 1/3 の Tyr が修飾された時 H^+ の透過はほぼ止まる (Fig. 8)。同様に DCCD (ジシクロヘキシルカルボジイミド) で疎水性領域になる Glu を修飾しても、フェニルグルオキザルで Arg を修飾しても失活が起こるので、 H^+ の膜内透過の機構としては DCCD 結合タンパク質のオリゴマーが作る解離基へのクラスターを H^+ がジャンプしてゆくというのが、F₀ における H^+ 透過の実体ではないかと考えられる^{11,12)}。

6. チトクローム酸化酵素の H^+ ポンプ活性

チトクローム酸化酵素(複合体IV)の構造については先に触れたが、この酵素の活性中心はヘム鉄と銅であり、水素伝達体を含んでいない。Fig. 5 で示したように、 O_2 の還元がチトクローム *c* の結合するところと逆の側で起こるとすれば、膜を横切る電子伝達が起こり、膜電位が生じる。 H^+ については、 $\frac{1}{2}O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O$ で、 H^+ の吸収が生ずるが、 H^+ の膜を横切る輸送は起こらないはずである。しかし多くの例はこれが起こることを示している¹³⁾。Fig. 9 は演者たちの例ですが、ウシチトクローム酸化酵素をプロテオリポソームに再構成し、少量の還元型チトクローム *c* を与えたもので、一電子の酸化当り 0.5~1 個の H^+ の放出が実際に起こることを示している(上段)。バリノマイシン存在下での K^+ の動

Fig. 9 H^+ 輸送と電荷分離に対するジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD) の影響

上段は嫌気条件での還元型チトクローム *c* パルス (1.77 nmol) を与えたときの pH メーターの記録。下段は K^+ 電極での記録。酸素パルスは 1.25 nmol。ジシクロヘキシルカルボジイミド 1.8 mM, 25°C, 150 min を作用させたウシチトクローム酸化酵素小胞を使用 (曾根, 柳田: 生化学 53, 1 (1981))

Fig. 10 チトクローム酸化酵素における e^- と H^+ の輸送

Fig. 11 呼吸鎖の部位ごとの H^+ の動きと化学量論比

きをカチオン電極で測定することにより、電荷移動を測定すると(下段), $1 \sim 2 e^-$ の値となる。F₀ の H^+ 透過能を阻害することで知られている DCCD は H^+ 輸送をほぼ完全に押さえるが、電荷移動の半分は DCCD で押さえられず、したがって Fig. 10 のような輸送が酸化還元反応に共役して起こったとして理解できる。ほぼ同様の実験は好熱菌のチトクローム酸化酵素でも行うことができ、チトクローム酸化酵素は単なる電子伝達ではなく、同時に H^+ を輸送するポンプということになる。また細菌のチトクローム酸化酵素は、ミトコンドリアのものが 7 個以上の異なるサブユニットで構成されるのに対して、

2～3個のサブユニットで構成されているという単純さを持っている^{14,15)}.

7. 呼吸鎖における H^+ 輸送の機作

ミトコンドリアの呼吸鎖について、プロトンと電子の膜を横切る輸送について、ループ説では説明できないこと、そしてプロトンと電子の動きについて比較的に進んだ例を述べた。Fig. 11 は呼吸鎖の H^+ 輸送の機作についてまとめたものであるが、確定的なものではない。部位 I の所は FMN と (Fe-S) 中心という水素伝達体と電子伝達体が組み合わされたものであるが、これらが可動担体としてループを作るとは思えず、複合体 I の分子内部に H^+ のチャンネルがあり、酸化還元反応自体は M 側の表面近くで行われるという説が有力である。部位 II では脂溶性の低分子化合物であるユビキノンが存在しており、ループがあるいは可能かもしれない。Mitchell が想定するように、セミキノンが重要な働きをし、水素伝達体として 2 回使われる可能性があるが(キノンサイクル)¹⁶⁾、実証はされていない。部位 III (チトクローム酸化酵素部位) はすでに述べたように H^+ -ポンプを想定する必要がある。結局部位 I～III まで、述べてきた説がそれぞれ正しいとすれば、 H^+ は部位によって異なる機作によって

運ばれるということになる。そして全体としては NADH の酸素酸化に共役して 8 個の H^+ が輸送され、 $1H^+$ が ADP と Pi の輸送のため用いられ、 $2H^+$ の動きで 1ATP ができることになる¹⁷⁾。

おわりに

以上を簡単にまとめると、1) 酸化的リン酸化反応が H^+ の異方的な動きによって共役されている、すなわち Mitchell の化学浸透圧説の要点は正しく、これはさらに種々の生体膜に適用できよう。2) Mitchell は H^+ 輸送の機作としてループ説を考えたが、これに合わないデータは多い。3) これに代わり膜タンパク質内での電子の移動や H^+ のポンプチャンネルによる輸送が重要な役割を果たしていると思われるが、その詳細な機作の解明は今後の課題である。

最後に電子輸送膜の再構成(人工膜の作成)について、生化学の立場から、天然の酵素を最大限に生かしたものを Fig. 12 に示した。A ではバクテリオロドプシンを方向性をそろえて薄膜に成型したものを考えている。現在はリン脂質に懸濁したバクテリオロドプシンをミリポア膜に浸み込ませて作っているが、さらに改良する必要がある。B はバクテリオロドプシンと好熱性細菌の ATP

Fig. 12 電子輸送膜の再構成。左はバクテリオロドプシンを含む光電池。右は H^+ -ATP 合成酵素と組合わせた光依存性 ATP 供給系。

合成酵素を共に含むリポソームを示している。これは光依存性の ATP 合成を行うことができる¹⁸⁾。再構成の方法に工夫を加え能率的なものにできれば、種々の ATP 要求性の反応に副産物なしに ATP を供給することができる。この時、好熱性 H⁺-ATP 合成酵素を容易に大量にとる工夫としては、現在流行の遺伝子工学の手法を用いて、好熱菌の H⁺-ATP 合成酵素の遺伝子をプラスミッドに結合し、H⁺-ATP 合成酵素のない大腸菌に加え増幅することが考えられる。好熱菌の酵素は熱安定なので、大腸菌の諸タンパク質を熱失活することにより簡単に大量精製ができる可能性がある。

文 献

- 1) S. J. Singer, G. L. Nicolson: *Science*, **175**, 720 (1972)
- 2) P. Mitchell: *Biol. Rev.*, **41**, 445 (1966)
- 3) 曾根勇史, 平田肇: 化学と生物, **16**, 276 (1978)
- 4) 笠原道弘: 蛋白質核酸酵素, **24**, 1077 (1979)
- 5) P. C. Hinkle: *Fed. Proc.*, **32**, 1988 (1973)
- 6) B. Chance: In "Membrane Bioenergetics" (Lee, C. P. et al. eds) p.1 (1979)
- 7) N. Tanaka, T. Yamane, T. Tsukihara, T. Ashida, M. Kakudo: *J. Biochem.*, **77**, 174 (1975)
- 8) A. Lewis, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4642 (1978)
- 9) Y. Kagawa, N. Sone, H. Hirata, M. Yoshida: *J. Bioenerg. Biomembr.*, **11**, 39 (1979); 香川靖雄: 膜, **5**, 97 (1980) 参照
- 10) W. Sebald, J. Hoppe, E. Wachter: In "Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport" (Quagliariell, E. et al eds) p.63, Elsevier, Amsterdam (1979)
- 11) N. Sone, K. Ikeba, Y. Kagawa: *FEBS Lett.*, **97**, 61 (1979)
- 12) N. Sone, T. Hamamoto, Y. Kagawa: *J. Biol. Chem.*, **256**, 2873 (1981)
- 13) M. Wikström, K. Krab: *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 281 (1979)
- 14) B. Ludwig: *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 177 (1981)
- 15) N. Sone, Y. Yanagita: *Biochim. Biophys. Acta* 印刷中
- 16) P. Mitchell: In "Third Intern. Symp. on Oxidases and Related Oxidation-Reduction Systems" (King, T. E. et al. eds) University Park Press, Baltimore, in press.
- 17) 曾根勇史, 柳田豊: 生化学, **53**, 1 (1981)
- 18) N. Sone, Y. Takeuchi, M. Yoshida, K. Ohno: *J. Biochem.*, **82**, 1751 (1977)

文献抄録

ヒト神経芽細胞腫, グリオーマ, 肉腫およびテラトーマ細胞膜上の Thy-1 抗原決定基の単クローン性抗体による検索

Definition of a Thy-1 Determinant on Human Neuroblastoma, Glioma, Sarcoma, and Teratoma Cells with a Monoclonal Antibody

R. C. Seeger, Y. L. Danon, S. A. Rayner and F. Hoover: Division of Cancer Immunology and Biology, Department of Pediatrics, Center for the Health Sciences, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA, USA

J. Immunol., **128**, 983-989 (1982)

神経性外胚葉由来の腫瘍は、その分化度に応じた細胞膜分子を発現することがある。この分子上の抗原決定基は腫瘍の免疫診断と免疫治療、腫瘍細胞の由来や分化度の決定あるいはこれらの細胞膜分子の一部が腫瘍発生に係わる細胞機能を調節している可能性などの点で興味もたれる。本論文はヒト Thy-1 分子の抗原決定基と反応する新しい単クローン性抗体 (ab 390) の報告であり、神経芽細胞腫, グリオーマ, 軟部肉腫, テラトーマ細胞がヒト Thy-1 抗原決定基を発現していることを初めて証明した。ab 390 を産生する融合細胞はヒト胎児脳組織で免疫されたマウス脾細胞と骨髄腫細胞との融合で作られた。

ab 390 の Thy-1 抗原決定基に対する特異性は次のようにして示された。1) ab 390 と反応する抗原決定基 (ag 390) の正常細胞や組織上の分布がヒト Thy-1 抗原の分布と一致した。ab 390 を成人組織で吸収した結果、脳に大量の ag 390 が証明され、腎はその 1/90, 肺, 胸

腺, 肝, 副腎, 大腸, 筋肉では 1/150~1/10,000 程度に過ぎなかった。ab 390 は培養線維芽細胞と強く反応し、胸腺細胞の12%とも反応した。一方、血中の単球, リンパ球, 赤血球や骨髄細胞と反応しなかった。2) ag 390 の分子量 (Mr=24,000) はこれまでに報告された Thy-1 抗原分子量とほぼ一致した。3) ab 390 の神経芽細胞腫細胞への結合が既知の Thy-1 抗原で阻止された。

29系統の培養腫瘍細胞について検索した結果, ab 390 はグリオーマと強く、神経芽細胞腫, 横紋筋肉腫, 平滑筋肉腫, テラトーマと中等度に反応した。髄芽細胞腫, メラノーマ, 癌細胞とは弱く反応する場合と有意に反応しない場合とあった。ab 390 を非培養腫瘍で吸収した結果, 神経芽細胞腫, グリオーマおよび軟部肉腫には脳を除く全ての成人組織より多量の ag 390 を発現するものがあることが知られた。以上の成績より, 様々なヒト腫瘍細胞がその細胞膜上に Thy-1 抗原を発現していることが示唆された。(鎌田貢寿, 大久保充人, 丸茂文昭)