

# 生 体 膜 と 化 学 反 応 制 御

Biological Membrane and Control of Chemical Reactions

豊 島 喜 則\*・野 崎 弘\*

Yoshinori TOYOSHIMA and Hiroshi NOZAKI

生体細胞中では、(1)の化学反応からえられる化学エネルギーを利用して、(2)の反応が自由エネルギーを獲得する方向に進む、2つの化学反応の共役が随所にみられ、この化学反応の共役に対して膜構造が重要な役割を果たしているようである。この膜の役割を知り、人工的にこの機能をもつ膜を作ろうとする試みがあるが本文ではその現状と問題点について解説する。

## 1. は じ め に

最近機能性高分子という言葉聞く機会が多く、その代表的な例としてよく合成高分子膜があげられる。高分子膜は合成皮革などの材料としての外に、空気中や水中の廃棄物の処理、かん水の淡水化、人工腎臓で代表される人工臓器、マイクロカプセル等々、膜を通してのいろいろな物質の透過性の違いを利用して、混合物からある特定の物質を分離する有力な手段として用いられている。ところで工業的な意味で膜を積極的に使い出したのは最近になってからであるが、生物の分野ではこの膜構造が種々の生命現象に重要な働きをしていることが古くから知られている。生命の最小単位である細胞はその表面を原形質膜によりおおわれているし、細胞内に存在する小嚢もそれぞれ独自の性質の膜をもっている。すべての生体膜に共通した基本的な機能は外界と物質およびエネルギーの授受をしながらかつ外界と異なる内部環境を作り上げそれを恒常的に維持することである。この領域内外におけるイオン分布の非対称性を維持するために、生体膜は物質の選択透過性の外にイオンやアミノ酸、糖などをそれぞれの電気化学ポテンシャル ( $\bar{\mu}_i$ ) の勾配にさからって輸送するいわゆる能動輸送の機能を持っている。1つの細胞全体を系とみなすと、それは開放系であるから化学種  $i$  の輸送が  $\bar{\mu}_i$  の勾配にさからう方向に起っていても不思議ではないが、そのためにはなんらかの形でそれに見合うエネルギーが輸送系に供給されなければならない。細胞膜 (原形質膜) 中での  $\text{Na}^+$  や  $\text{K}^+$  の能動輸送系では解糖あるいは呼吸によって生産されたアデノシン3リン酸 (ATP) をアデノシン2リン酸 (ADP) と無機リン酸 (Pi) に分解する際の自由エネルギー差を直接利用している。そしてこの ATP の加水分解からえられる化学的エネルギーを膜を通しての物質輸送というベクトル量に変るには膜内にそれに対応するエネルギー変換機構が存在していると考えられている。能動輸送によってえられる膜内外でのイオン分布の非対称

性は神経細胞や筋肉細胞の興奮性の主要因であるばかりでなく非興奮性の細胞においても重要な働きをしている。たとえば小腸上皮細胞における糖やアミノ酸の吸収は膜を横切った  $\text{Na}^+$  の濃度勾配を起動力としている。このようにイオン分布の非対称性は生命現象を維持するためのエネルギー源となる物質を細胞内に取込むための起動力となっている。この外に能動輸送の機能をもつ膜にはもう一つ重要な役割がある。ほとんどの細胞中に存在しているミトコンドリアは解糖あるいは呼吸系からえられる化学エネルギーを利用して ADP と Pi から ATP を合成している。このように(1)の化学反応からえられる自由エネルギーを利用して(2)の反応が自由エネルギーを獲得する方向に進む現象が生体系では普通にみられるが、この2つの反応間のエネルギーの受渡しに膜を通してのイオンあるいは電子の能動輸送が利用されているようである。このように物質透過制御の面から生体膜をみたとき、物質の選択透過性はたしかに生体膜の機能の1つではあるがそれは能動輸送の機能に比べかなり次元の低い機能である。しかしながら現在合成高分子膜に機能性を持たせようといった場合、その意味は選択透過性を持った膜を作ることである。そこで遠い将来をみた場合、能動輸送というもっと高次の機能を持った人工膜を作る目的での研究も進められるべきであろう。そのため本文では生体膜でみられる代表的な能動輸送の例をあげながら、それらに対する知見の1部を紹介するとともに能動輸送に対する人工膜系からのアプローチが現在どの辺まで進んでいるかを解説する。

## 2. 原形質膜 (plasma membrane) における $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の能動輸送

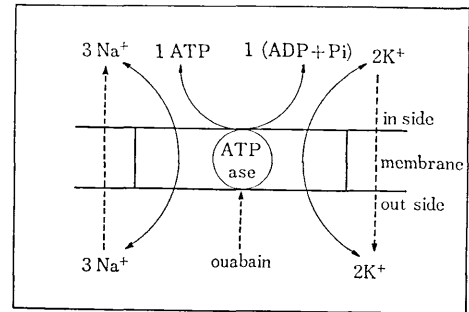
一般に動物細胞はその表面を原形質膜によりおおわれており細胞内外の物質のやりとりはこの膜を通して行われている。そして表1に例示したように細胞内には  $\text{K}^+$  が多く  $\text{Na}^+$  は少ないが、内部環境としての細胞外液には  $\text{Na}^+$  が多く  $\text{K}^+$  が少ない。ところで放射性同位元素を用いて調べてみると、細胞内外の  $\text{K}^+$  と  $\text{Na}^+$  は交換

\* 東京大学生産技術研究所 第4部

表 1 細胞内外の Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の濃度

|            | 内側濃度 (mmole/l) |                 |                                 | 外側濃度 (mmole/l) |                 |                                 |
|------------|----------------|-----------------|---------------------------------|----------------|-----------------|---------------------------------|
|            | K <sup>+</sup> | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> |
| ヤリイカ巨大神経軸索 | 410            | 49              | 8.4                             | 22             | 440             | 0.05                            |
| カニ神経繊維     | 360            | 43              | 8.4                             | 12             | 510             | 0.02                            |
| カエル縫匠筋     | 125            | 15              | 8.3                             | 2.6            | 110             | 0.02                            |
| ヒト血球       | 78             | 6.9             | 11.3                            | (血漿)           |                 | 0.03                            |
| ウム血球       | 91             | 5.1             | 17.2                            | (血漿)           |                 | 0.03                            |

していることがわかる。したがって細胞内外でのイオン組成の非対称性を保つためには、なんらかの形で Na<sup>+</sup> や K<sup>+</sup> が能動輸送されていなければならない。十数年以前 Skou<sup>1)</sup> によってカニの神経組織に Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の共存下で高い活性を示す ATP 分解酵素 (ATPase) の存在が発見されて以来、この酵素が Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の能動輸送を行う生体膜中に広く分布していることが明らかになった<sup>2)</sup>。またこれらの ATPase は単に ATP の加水分解反応の解媒となるだけではなく加水分解に伴う化学エネルギーを Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の能動輸送の仕事に変換するエネルギー変換機関の役割を果していることを間接的にはあるが示唆するいくつかの実験結果が得られている。たとえば、(a) ATPase の酵素活性 (ATP 加水分解能力) は細胞内外の溶液組成の方向性に依存する。赤血球やヤリイカの巨大神経軸索を例にとると、細胞内の ATP の加水分解は細胞内の Na<sup>+</sup> と外液の K<sup>+</sup> により促進されるが細胞内の K<sup>+</sup> と外液の Na<sup>+</sup> には関係しない。(b) ATP は細胞内に存在するときのみ輸送系に対するエネルギー供給源となりうる。(c) 赤血球では能動的な K<sup>+</sup> の取込みは外側 K<sup>+</sup> 濃度、(K<sup>+</sup>)<sub>o</sub> とともに増加しある一定値に達するがその 1/2 の値を与える (K<sup>+</sup>)<sub>i</sub> は細胞内部のイオン組成が普通の状態の時は 2 mM<sup>3)</sup> である。一方 ATPase の酵素活性も (K<sup>+</sup>)<sub>i</sub> とともに単調に増加し一定値になる。この最大活性値の 1/2 値を与える (K<sup>+</sup>)<sub>i</sub> は 3 mM<sup>2-a)</sup> で K<sup>+</sup> の取込に対するのとはほぼ同一の値をとる。同様のことが Na<sup>+</sup> の能動的な排出と ATPase の活性に対する内側の Na<sup>+</sup> 濃度、(Na<sup>+</sup>)<sub>i</sub> についても言える<sup>4,5,3-a)</sup>。(d) ウェバインなどの強心配糖体は酵素活性を阻害すると同時に Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> の能動輸送をも阻害する。ただし輸送系に対する阻害はウェバインが細胞外に与えられた時に限る<sup>2-b,6)</sup>。このような実験結果を総合してみると、原形質膜に存在している Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> と Mg<sup>++</sup> の存在下で酵素活性を示す ATPase) は単に ATP の加水分解を促進する触媒として働いているだけではなく Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の能動輸送と直接に結びついたエネルギー変換機関であると推測できる。またこの Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の能動輸送は独立ではなく Na<sup>+</sup> の能動的な排出と K<sup>+</sup> の取込みとは共役しており、もし細胞外の K<sup>+</sup> を人工的に取除くと能動的な Na<sup>+</sup> の排出は行われなくなる。この共役した Na<sup>+</sup> の排出量と K<sup>+</sup> の取込み量とそれに必要な ATP の加水分解量の間には

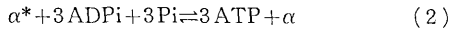
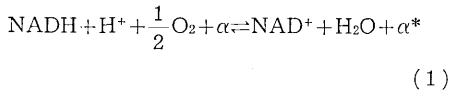
図 1 原形質膜における Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> の能動輸送系

3 : 2 : 1 (モル比) の関係が見出されている<sup>7,8,9)</sup>。このような知見を基にして Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> の能動輸送系の概念図を書くくと図 1 のようになる。ここでこの輸送系についてのもう一つの重要な知見を加えておく。Garrahan らはあらかじめ <sup>32</sup>P でラベルした無機リン酸と ATP と高濃度の K<sup>+</sup> を細胞内に含む赤血球を作っておき、それを K<sup>+</sup> を全く含まない Na<sup>+</sup> を含む液の中に移すと AT<sup>32</sup>P の生成が起ることを見出した<sup>10)</sup>。この AT<sup>32</sup>P の生成は外液中のウェバインや K<sup>+</sup> の存在によって阻害される。彼等の研究では ATP の総量の増加は認められなかったが、後年 Lew らは細胞内を高濃度の Na<sup>+</sup> で外液を高濃度の K<sup>+</sup> で置換えることによって豚の赤血球中の ATP の濃度が増加することを見出した<sup>11)</sup>。これらの事実はこの輸送系が逆回転もすることを示している。すなわち、赤血球を通常の生理状態と逆のイオン分布を持つ雰囲気中におくと Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の受動輸送 (それぞれの電気化学ポテンシャルの勾配に従って起る輸送) にともなって輸送系が逆回転するために ATP の生成が起ると考えられる。なお赤血球内での ATP の生成量と受動的な Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の輸送量の間には能動輸送によるイオンの輸送量と ATP の分解量の関係とほぼ同一の関係があることが知られている。以上から原形質膜中の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase を含む輸送系は ATP=ADP+Pi 反応と Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> の輸送を共役させる可逆性のエネルギー変換機関とみることができよう。むしろ赤血球膜や神経細胞膜にある ATPase の本来の役割は ATP を加水分解しそのエネルギーを Na<sup>+</sup> や K<sup>+</sup> の能動輸送に用いることであり、ATP を合成することではないが、後で述べるようにミトコンドリア内膜にある Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase は正反対の役割、すなわち ATP の合成を目的としており原形質膜中のそれとは別の機構で働いているようにみえるが、輸送系が本来は可逆系であるという事実は両方の ATPase の作用機構が本質的には同じである可能性をあたえているようである。

### 3. ミトコンドリア内膜での能動輸送と 2 つの化学反応の共役

今までの議論は細胞をとりまく原形質膜での能動輸送

に関してであったが、細胞質中には核、ミトコンドリア、小胞体 (endoplasmatic reticulum) 等々いろいろな使命を持つ小領域があり、それぞれ特有の膜でおおわれている。その中でミトコンドリアは先程も述べたように酸化リン酸化反応による ADP と Pi からの ATP の合成と NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) を介して細胞内での合成反応に必要な還元力を供給することを主たる生理機能としている。ここでは CoQ およびチトクローム群を含む呼吸鎖を通しての NADH (nicotinamide adenine dinucleotide 還元型) やコハク酸の酸化反応と ATP 合成の共役機構に対する膜の働きについて簡単に述べてみる。形式的に反応を書いてみると



となる。ここで  $\text{NAD}^+$  は NADH の酸化型である。 $\alpha$  および  $\alpha^*$  は未知のもので反応 (1) で  $\alpha$  が高エネルギー状態を表す  $\alpha^*$  になり、(2) の反応では  $\alpha^*$  が  $\alpha$  になる時のエネルギーを使って反応が進むことを表わしている。しかしこの  $\alpha, \alpha^*$  は仮説的なものであり  $\alpha = \alpha^*$  の変化をある化合物の構造変化とみるか<sup>12)</sup>、膜自体の構造変化とみるか<sup>13)</sup>、物質の輸送をとまうような物理的状态の変化とみるか<sup>13,14)</sup> の大きく分けて3つの考え方が対立している。Skulachev<sup>15)</sup> は後に示すような巧みな実験により牛の心筋中のミトコンドリアとかそれを超音波処理した並ミトコンドリア粒子では (1), (2) の反応の共役はミトコンドリア内膜と呼ばれるミトコンドリアをおおっている膜を通してのイオンの能動輸送と密接に関係していることを示した。そこで以下にこの実験結果を説明するのに都合の良い Mitchell<sup>16)</sup> らによる化学浸透仮説 (Chemiosmotic hypothesis) を紹介してみる。この仮説は呼吸鎖自身が膜を介してその外側を正に内側を負にするように電荷分離をさせる機能を持っており、内側での NADH あるいはコハク酸の酸化によって呼吸鎖が膜を通して  $\text{H}^+$  を外向に輸送するという基本仮定の上に立っている。このようにしてできた  $\text{H}^+$  の内外での濃度分布の異った状態が  $\alpha^*$  の状態に対応し、そしてその  $\text{H}^+$  が別に膜中に存在している ATPase を介して受動輸送されることによって得られるエネルギーを用いて ATP の合成を行っていると考えられている。図2はこの仮説の概念図である。この系に脂溶性弱酸(解離型も非解離型も膜を透過できる)を加えると ATP の生成が阻害される。この現象は呼吸鎖によって作られた  $\text{H}^+$  輸送による電荷の分離を打消す方向に脂溶性イオンが ATPase を介さずに膜を通して外側に出てしまうためであるとみ

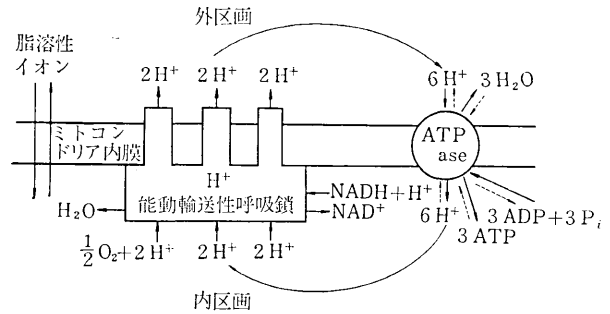


図2 Chemiosmotic 仮説の概念図。呼吸鎖によるプロトンの濃度勾配の生成と ATP 合成の共役

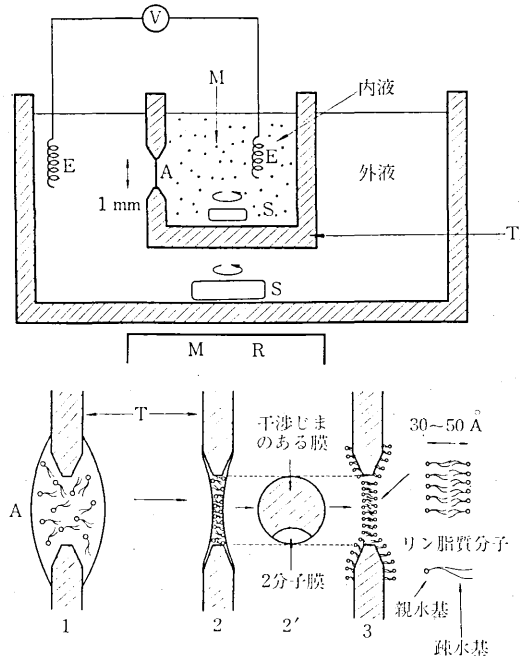


図3 2分子膜による脂溶性イオン電極を利用したミトコンドリア内外での化学エネルギー依存性電位差の測定装置と2分子膜の作製過程。

A. 2分子膜, E. Ag-AgCl 電極, M. ミトコンドリア粒子, MR. マグネチックスターラー, S. 攪拌子, T. テフロンポット, V. エレクトロメーター。下図はA部分の拡大図である。テフロン製の槽の穴(径1mm)の部分にリン脂質を n-デカンなどの溶媒に溶したものは塗布<sup>17)</sup>して数分放置すると、干渉じまのあらわれる数千 Å の厚みの膜(2)になり、さらに数分すると穴の下部の方からなにも見えなくなる領域があらわれ(2')その領域が膜全面に広がる(3)。

なせば理解できる。さて Skulachev らの研究<sup>15)</sup>であるが、彼等は図3に示すように2つの水溶液相をリン脂質の2分子層膜で隔てた系を用いた。この膜系は Rudin および Mueller<sup>16)</sup> により初めて作られたものであるが、まずリン脂質を n-デカンなどの有機溶媒中に溶しそれを3図中のAの部分に塗布し数分から10分程度放置しておくと同図のような過程を経て大部分の有機溶媒を膜外に排せきしてリン脂質の2分子膜構造をとる。この膜系は生体膜のモデル膜系としてよく研究されているので後

程のべることにするが Skulachev らはこの膜系をモデル膜としてではなく、この膜がいろいろな脂溶性のイオンを選択的に透過させることに着目し、それらのイオンに対する電極として用い、水溶液中の  $\text{PCB}^-$  (phenyl dicarbaundecabarane anion) や  $\text{DDA}^+$  (dibenzyl dimethylammonium) などの脂溶性イオンの濃度変化をリン脂質膜による膜電位差の変化としてとらえた。生体膜中には脂質が多く含まれているため、脂溶性のイオンは膜の脂質部分を比較的容易に受動的に透過するので、ミトコンドリアを分散させた水溶液中（ミトコンドリアに対しては外液）でのこれらのイオンの濃度変化はミトコンドリア内外でのこれらのイオンの輸送に有効な自由エネルギー差の変化を反映するはずである。彼等はこの系を利用してミトコンドリア中での反応のエネルギー供給源となる NADH やコハク酸あるいは ATP や能動輸送に対する阻害剤として知られている物質が脂溶性イオンのミトコンドリア内外での分布に与える影響を調べた。まずテフロンポットの内外に等濃度の  $\text{PCB}^-$  水溶液を入れ 2 分子膜を作り、次に内側のみミトコンドリアを粒子を加える。脂溶性の  $\text{PCB}^-$  はミトコンドリア膜の脂質の部分にある程度吸収されるため内側の自由な  $\text{PCB}^-$  濃度が減少し、そのために内側が正の方向の膜電位を発生し、数分後一定の値となる。このようにしておいてから先程の物質を加えた場合の膜電位の変化を  $\text{PCB}^-$  濃度の変化に換算したものを図 4 に示した。彼等の実験から得られた結果を要約すると、1. 牛の心筋ミトコンドリアではエネルギー源の供給により負イオン ( $\text{PCB}^-$  など) を排出し、正イオン ( $\text{DDA}^+$  など) を吸収した。すなわち脂溶性イオンはその化学構造よりも荷電が正か負かによってエネルギー依存性の透過の方向が

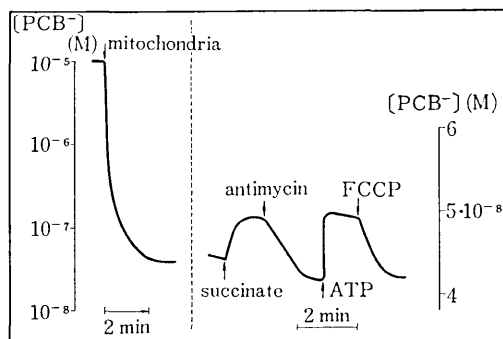


図 4 ミトコンドリア外液中  $\text{PCB}^-$  の濃度変化。—エネルギー供給源と阻害剤の影響—

FCCP: P-trifluoromethoxycarbonyl cyanide phenylhydrazone (阻害剤 uncoupler), antimycin: 呼吸作用阻害剤。

注: ミトコンドリアを  $\text{PCB}^-$  を含む水溶液中加入した場合ミトコンドリア内膜中の脂質の部分に脂溶性の  $\text{PCB}^-$  が溶込むため水溶液中の  $\text{PCB}^-$  濃度が減少する。エネルギー依存性の  $\text{PCB}^-$  の再分布の測定は一度平衡に達したのちに行われたものである。

決った。2. ミトコンドリア内膜の呼吸鎖におけるエネルギーの吸収は 4 つの部位から成るが、それぞれの部位でのエネルギー供給源となる物質のすべてに対してイオンの移動がみられたばかりでなく、合成目的物質である ATP もイオンの移動に対して有効に働いた。これはミトコンドリア内膜にある  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase も条件しただけでは ATP の合成、分解両方に働く可逆のエネルギー変換機関であることを示している。3. ミトコンドリアとそれを超音波処理してえた亜ミトコンドリア粒子とではその膜のベクトル性が反対になっているが、エネルギー依存性のイオン移動についてもこの反転がみられた。

4. 呼吸鎖の各部位に対する抑制物質はエネルギー依存性のイオン移動を抑制した。ここで用いられた脂溶性のイオンは生体から得られたものではなく、それらに対して特別に輸送機関が膜中に存在するとは考えられないから、それらの移動を起すための motive force はそれ自身の濃度差と電位差のみであることを考慮すれば、上の結果は化学的エネルギーの供給によりミトコンドリア内膜の内側を負に外側を正にする阻害剤感受性の電位差が起ることを示している。これは Mitchell の仮説とよく一致する。しかし呼吸鎖自身が  $\text{H}^+$  を外に排出する機能を持つという Mitchell の仮説が直接に証明された訳ではない。現在までのところ、呼吸系に共役した膜内外での電荷分離の機構は分っていないが少なくとも反応 (1), (2) の共役と膜の両側に電位差を作るようなイオンの能動輸送とが密接な関係にあることだけは事実であろう。呼吸鎖系および ATPase 系が如何なる機作でイオンの能動輸送を行っているかという問題に対して詳しい分子構造を仮定した理論模型が提出されているが、それらが新しいしかも物理化学的なベースにささえられた概念の提出につながらなかり単なる知的な遊戯に止まるであろう。そこで生体膜にあらわれるこの機能を研究するため、将来このような機能を持つ人工的な膜を作る可能性を追求するための一つの手段として、注目している機能を持つ膜から、その機能を発現させているであろう要素を一度分離して、それをもう一度人工的に作った膜に組込せて、元の機能を再成させる方法が考えられる。これによって特定機能に対してどの要素が本質的な働きをしているかが分るであろう。一般的にいって生体膜には脂質（特にリン脂質）が多く含まれている。この脂質を用いると先程も述べたように水溶液中に図 2 でしめした 2 分子層膜を作ることができる。この構造は 1935 年に Danielli と Davson<sup>17)</sup> が提唱した原形質膜についての模型と一致しているところから一時は生体膜のモデル系として多くの研究者によりその物性が調べられた。この 2 分子層膜の電気容量は  $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  程度で原形質膜のそれとよく似ており、生体膜中にも脂質の 2 分子膜構造が存在している可能性を示している。しかしな

表 2 脂質 2 分子膜の性質

| 膜形成脂質                              | 電気容量<br>$\mu F/cm^2$ | 厚 さ      |          | 電気抵抗<br>$ohm \cdot cm^2$ |
|------------------------------------|----------------------|----------|----------|--------------------------|
|                                    |                      | 電氣的<br>Å | 光學的<br>Å |                          |
| Lecithin (egg)                     | 0.33~0.45            | 48~56    | 46~72    | $10^9 \sim 10^9$         |
| 合成 Dioleoyl lecithin               | 0.33                 | 56       |          |                          |
| Phosphatidyl ethanolamine          | 0.28~0.45            |          |          | $10^9 \sim 10^7$         |
| Phosphatidyl serine                | 0.33~0.5             |          |          | $10^8$                   |
| Phosphatidyl inositol              | 0.29                 |          |          | $10^8$                   |
| Lecithin+Cholesterol               | 0.38~0.56            |          |          | $10^9 \sim 10^7$         |
| Oxidized cholesterol               | 0.57                 |          | 40       | $10^8$                   |
| Sorbitan monopalmitoleate          | 0.43                 | 43       |          |                          |
| Dodecyl acid phosphate+Cholesterol | 0.69                 |          |          | $10^8 \sim 10^7$         |
| Diocetadecylphosphite+Cholesterol  | 0.74                 |          |          | $10^9 \sim 10^8$         |
| $\alpha$ -Tocopherol               | 0.6                  |          |          | $10^8 \sim 10^7$         |
| Hexane, Heptane                    |                      |          |          | $5 \times 10^9$          |
|                                    |                      |          |          | 比抵抗値を厚さ 50 Å の膜に換算して     |
| 生物細胞膜                              | 0.5~1.5              |          |          | $10^9 \sim 1$            |

からその電気伝導度やイオン透過性は表 2 に示すごとく生体膜に比べて非常に小さく、仮に生体膜中に 2 分子膜構造が存在しているとしてもそこを通して  $K^+, Na^+, H^+$  や一般の陰イオンが透過しているとは考えられない。生体膜はこの 2 分子膜構造をもった脂質と蛋白質とがある特殊な配列をとってイオン透過を制御する機能を作り出しているようである。こうしてみると脂質による 2 分子膜系は生体膜機能の再構成を行うための基本膜として適した系であるといえる。実際この 2 分子膜系を使って生体膜の別の機能であるイオン選択透過性と興奮性を持つ人工膜を作るのに成功した例もある。たとえばイオンの選択透過性については、この 2 分子膜系に生体膜中には存在しない環状蛋白質の 1 つであるバリノマイシン (図 5) を  $10^{-9}$  mole/l 程度加えると、その膜の  $K^+$  に対する透過性は  $10^5$  倍以上になる。しかも  $K^+$  に対する透過性は  $Na^+$  に対するその 200 倍にもなることはよく知られた事実である。このリン脂質 2 分子膜-蛋白質系のイオン選択透過性については花井らの総説があるので参照されたい<sup>18)</sup>。しかしながら現在までのところ化学反応とイオンなどの能動輸送を共役させる物質は生体膜中の成分としてしか見だされておらず、したがって能動輸送を持つ膜の再構成を目指し、生体膜中から分離した機能物質 (今のところは膜に結合している ATPase を主に) をリン脂質膜に組込むとする試みが多くの研究室でなされているが再現性の高い成功例はない。その中でも成功した部類に入るものとしては Jain らによる研究がある<sup>19)</sup>。彼等はラットの脳の cortical tissul からシヨ糖密度勾配法によって分離した  $Na^+-K^+$  ATPase を多量に含む分割 (E 分割と呼んでいる) 採集した。一方コレステロール、酸化コレステロール、ドデシルリン酸の混合物を n-デカンとテトラデカンの混合溶媒中に溶し、それをを用いて 3 図のような 2 分子膜系を作った。水溶液相は PH buffer と NaCl および KCl を含んでいる。こ

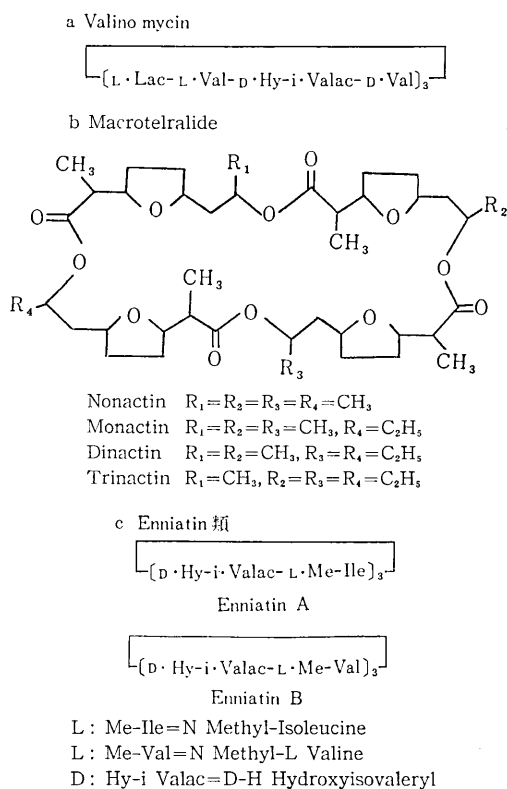


図 5 脂質 2 分子膜にイオン透過性を与える環状ペプチドの例とその化学構造

のままでは膜の電気抵抗は約  $10^9 \Omega cm^2$  であるが、この水溶液相の片方に先程の分割 E を加えると抵抗は蛋白質濃度とともに減少し  $10^8 \Omega cm^2$  程度になる。この状態にしておき ATPase の入っている側の溶液中 (cis-side) に濃度が  $10^{-3} M$  程度になるように ATP を加えると cis-side から trans-side (ATPase が含まれていない側の溶液) へ向けて短絡電流が観察されたと報告している。またこの短絡電流は trans 側に  $10^{-5} M$  程度のウエバ

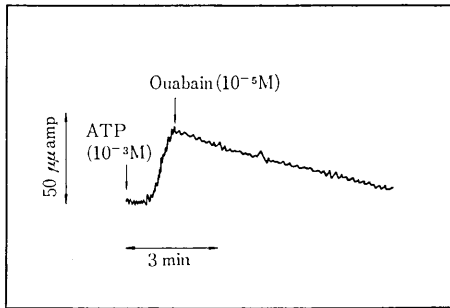


図 6 ATPase を含む 2 分子膜系に ATP およびウアバインを加えた場合の短絡電流の時間変化。ATP は ATPase を含む側にウアバインはその反対側に加えられた。

ンを加えることによって消滅する。彼等の示した短絡電流の代表例を図 6 に示す。しかし全く同一であると思われる条件の下で実験を行っても、膜抵抗の減少とかエネルギー依存性の短絡電流が観測できるのはまれであり、また短絡電流が現われてもその値はまちまちで定量的な議論のできるところまでにはなっていない。最近の“Biological Interaction and Transport” に関しての Gordon Research Conference でも、この研究をも含め能動輸送に対する再構成膜の研究は大きな話題になったが、再現性が低いため再構成膜ができたとは一般的には必ずしも認められていない。筆者ら<sup>20)</sup>も脂質 2 分子膜を骨格とする膜による能動輸送機能の再構成を目的として、バクテリア (*Streptococcus faecalis*) の原形質膜に osmotic shock を与えて膜 ATPase を溶出し、カラムクロマトによりそれを精製した。この ATPase は分子量が 385,000 で 6 個の等価な subunit からできている。これと同じバクテリアの原形質膜中から抽出した全脂質を用いて作った 2 分子膜中に組込むことには成功した。両者の再結合のためには水溶液中に  $Mg^{+2}$  などの 2 価陽イオンが必要である。今のところ ATPase が 2 分子膜中に組込まれている証拠は 2 分子膜の電気抵抗が  $10^{2-3}$  程度減少し Jain らの結果と同じように cis 側に ATP を加えた場合にときたま短絡電流が観測されることしかない。図 2 に示した 2 分子膜系ではテフロン板上の穴は直径 1 mm であるため膜面積が非常に小さく電気的性質の測定には適しているが、物質の透過を直接測定することはできない。そこで筆者ら<sup>21)</sup>は  $0.5 \text{ cm}^2$  程度の膜面積を持つ球状の 2 分子膜を作り、電気的性質と同時にラジオアイソトープによる物質透過の直接測定を可能にした。将来この 2 分子膜系を基本膜に選んで再構成膜を作り、化学エネルギー依存性の  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  などの輸送直接の測定を計画している。Jain らあるいは筆者らが見出した現象がかりに化学エネルギー依存性のイオン輸送であったとしても、まだそれは (化学エネルギー→能動輸送) の片道のエネルギー変換であり、今後、外部電

場とか外部条件としてあたえられた  $Na^+$ ,  $K^+$  の濃度差によってこの膜系が ADP と  $P_i$  から ATP を合成する事実をつかまないうかぎり、能動輸送に対する再構成膜としては十分ではない。それで現在も多くの研究室で化学エネルギー⇌能動輸送の可逆的エネルギー変換能力を持つ再構成膜を作る努力がされている。

#### 4. 共輸送による能動輸送

原形質膜でのイオン能動輸送には ATP が必要であり、その ATP はミトコンドリアでの呼吸系や解糖からの化学エネルギーを使って合成されていることを述べてきた。そこで最後にエネルギー源であるたとえば糖の細胞内への取込の機構を簡単にのべておく。小腸上皮細胞中の糖の輸送を例にとると、糖の輸送を  $Na^+$  との共輸送で説明しようという説が主流をなしている。その機構は以下の通りである。膜中に  $Na^+$  と糖 (S) とを同時に結合する担体 X が存在しており、内外の溶液と接している膜面で



の化学平衡が成立している。この平衡は内外の溶液中での  $Na^+$  と S との濃度によって決定されるから、細胞膜中の別のところにある  $Na^+$  の能動輸送系によって、細胞内の  $Na^+$  濃度が外液中よりも低い、すなわち通常の生理状態に保たれていれば、特別のエネルギー供給源がなくても、 $SXNa^+$  および X が膜内でそれぞれの濃度差によって移動することさえできれば S を細胞内に取込むことができる。換言すれば、糖は X を介して別の機構でえた  $\bar{\mu}_{Na^+}$  の勾配を利用して細胞内に蓄積される<sup>20)</sup>。この考え方を支持するものとして以下の実験事実がある。(a) 糖の細胞中への内向輸送速度は外液の  $Na^+$  濃度,  $(Na^+)_o$  に最も強い影響を受け、 $(Na^+)_o$  の増加とともに増加する。いま外液の  $Na^+$  を他の 1 価陽イオンでおき換えると糖の能動輸送は完全に抑制される<sup>22)</sup>。(b) 糖の能動輸送は  $Na^+$ ,  $K^+$  の能動輸送系に対する阻害剤で阻害されるが、それはあくまでも間接的なものであり、阻害剤の存在下でも人工的に  $(Na^+)_o$  を高く  $(Na^+)_i$  を低くすれば、糖の能動輸送は正常の場合と同じように起る<sup>22)</sup>。(c) 非電解質である糖の内向輸送にともなって細胞内外に  $Na^+$  の内向輸送に対応するような糖誘発電位を発生する。これは外液の糖濃度を変えることにより (3) 式の平衡がずれて、そのために  $Na^+$  が共輸送されたものと考えられる<sup>24)</sup>。この外に共輸送機構を支持する糖と  $Na^+$  の輸送の kinetics に関する数多くの研究があるが<sup>25)</sup> ここでは省略する。 $i$  成分がそれ自身の  $\bar{\mu}_i$  の勾配に逆って起る輸送を Ussing らの定義により能動輸送と呼ぶならば、糖の輸送も能動輸送であるといえる。しかし、こういう意味での能動輸送ならば生体膜系に限られたものではない。たとえば、イオン交換膜とか

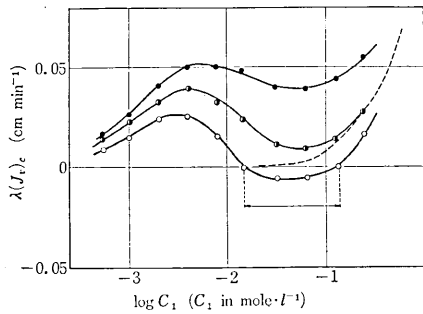


図7 負荷電膜中の水の移動速度の塩濃度依存性  
 ○; LiCl, ●; KCl, ●; KIO<sub>3</sub>, 破線はショ糖溶液中で実験値。  
 注: 溶質濃度を  $C_1, C_2 (C_2 > C_1)$  とし  $(C_2/C_1)$  を2に保ちながら  $C_1$  を変化させた場合の水の移動速度の測定値である。なお  $\lambda$  は膜の幾何学的定数である。膜により隔てられた両溶液相は等静水圧下であり電気的には Open circuit の状態にある。

酸化コロジオン膜のような解離基を持った人工膜で2つの水溶液相を隔てた場合を考えてみる。2つの水溶液相が濃度の異った1種類の非電解質溶液の場合は溶質は高濃度側から低濃度側へ、溶媒である水は反対方向にそれぞれの自由エネルギー差にしたがって移動し、その速度はともに溶質の濃度差に比例するが、溶質が電解質の場合には水の流束は溶質の濃度差に比例しないで、図7のような挙動をとる。とくに負荷電膜で溶質としてLiClのような水溶液中で負イオンの易動度が正イオンのそれよりも大きな電解質を用いた場合には、水の流束はある濃度範囲で高濃度側(溶質について)から低濃度側へと流れる<sup>26)</sup>。この現象は明らかに水分子の能動輸送といえるが、これはイオンの拡散流にともなって生じる膜内での電位の勾配が負の固定電荷があるために膜内の溶液中に存在している正の過剰電荷に働いて、膜内の溶液に電気的な体積力を与えることによるとして理解できる<sup>26)</sup>。

以上のように膜系でみられる能動輸送にもいろいろな機構があることがお分かりいただけたと思う。

## 5. おわりに

物質透過にともなう生体膜の機能を大別すると、1. 選択透過性、2. 興奮性、3. 能動輸送の3つに別けることができる。本文ではその中でもっとも高次の機能であると思われる能動輸送に焦点を合わせて解説したが、最後に能動輸送に必要な化学エネルギーを物質輸送のエネルギーにかえるエネルギー変換機関の熱効率を検討してみよう。海水中のイカの巨大神経軸索を例にとれば、イオンの分布は細胞内部で  $\text{Na}^+$  が約 50 mM,  $\text{K}^+$  が 400 mM, 細胞外液で  $\text{Na}^+$  が 450 mM,  $\text{K}^+$  が 20 mM であり、膜の内側は外側に対して  $-60 \text{ mV}$  の電位差をもっている。この状態の下で内側にある 1g 当量の  $\text{Na}^+$  を細胞外に準静的過程で排出するためには約 2.7 kcal/mole,

1g 当量の  $\text{K}^+$  を細胞内に取込むには約 0.5 kcal/mole のエネルギーが必要であるから、図1で示したように 3g 当量の  $\text{Na}^+$  を排出し 2g 当量の  $\text{K}^+$  を取込むためには 9.1 kcal/mole が必要である。一方 ATP を ADP と  $\text{P}_i$  に分解する際にえられるエネルギーは 12 kcal/mole だから、この変換機関の効率は最低 75% という高い値を示すことになる。もしその機構が解明され人工膜系に利用できれば優れたエネルギー変換機関となりうるであろう。利用という面でもう一度繰返しておきたいことは、今日まで有機合成化学の分野でピーカーの中で反応(1)の自由エネルギー差を利用して、反応(2)を uphill の方向に進める機能を有する膜構造をもった触媒の研究は行われていないと思う。最近、特殊に構造を持つミセル界面での有機物化学反応に興味を持たれており、触媒としての膜構造の役割が少し考えられるようになったが、今のところこれも down hill の反応に対してだけである。生体系は膜構造にともなう能動輸送を利用すれば down hill と up hill の2つ以上の反応を共役させるような触媒を作り出す可能性を教えているようである。

(1974年3月22日受理)

## 参 考 文 献

- 1) J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394 (1957)
- 2) たとえば 2-a R. L. Post, C. R. Merritt, et al., *J. Biol. Chem.* **235**, 1796 (1960); 2-b E. T. Dunham, I. M. Glynn, *J. Physiol.*, **156**, 274 (1961)
- 3) I. M. Glynn, *J. Physiol.* **134**, 278 (1956)
- 4) R. A. Post, P. C. Jolly, *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 118 (1957)
- 5) J. F. Hoffman, *J. Gen. Physiol.* **45**, 837 (1962)
- 6) J. C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 6 (1960)
- 7) P. J. Garrahan, I. M. Glynn, *J. Physiol.* **192**, 217 (1967)
- 8) R. Whittam, M. E. Ager, *Biochem. J.*; **97**, 214 (1965)
- 9) A. K. Sen, R. L. Post, *J. Biol. Chem.*, **239**, 345 (1964)
- 10) P. J. Garrahan, I. M. Glynn, *J. Physiol.*, **192**, 237 (1967)
- 11) V. L. Lew, I. M. Glynn, J. C. Ellory, *Nature*, **225**, 865 (1970)
- 12) たとえば E. C. Slatter, *Nature*, **172**, 975 (1953)
- 13) P. Mitchell, *Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction*, 1968 Glynn Research Ltd., Bodmin
- 14) J. T. Penniston, R. A. Harris, J. Asai, D. E. Green, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**, 624 (1968); R. A. Harris, M. A. Asbell, J. Asai, W. W. Jally, D. E. Green, *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**, 545 (1969)
- 15) L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, Y. P. Kadziauskas, E. A. Liberman, V. P. Skulachev, V. P. Topali, L. M. Tsolina, M. A. Vladimirova, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 1 (1970); L. E. Bakeeva, et al. *ibid.*, **216**, 13 (1970); P. I. Isaev, et al., *ibid.*, **216**, 22 (1970)
- 16) P. Mueller, D. O. Rudin, In *Current Topics in Bioenergetics*, ed. by D. R. Sanadi, Academic Press; New York and London, **3**, 157 (1969)
- 17) J. F. Danielli, H. Davson, *J. Cell. Comp. Physiol.*,

- 5, 495 (1935)
- 18) T. Hanai, 油化学, **21**, 289 (1972)
- 19) M. K. Jain, F. P. White, A. Strickholm, E. Williams, E. H. Cordes, J. Membrane Biol. **8**, 363 (1972)
- 20) Y. Toyoshina, T. E. Thompson, Gordon Research Conference, Biological Interaction and Transport (1971)
- 21) Y. Toyoshima, T. E. Thompson, submitted in J. Biol. Chem. (1974)
- 22) E. Riklis, J. H. Quastel, Canad. J. Biochem. Physiol., **36**, 347 (1958)
- 23) J. J. Hajjar, A. S. Lamont, P. F. Curran, J. Gen. Physiol., **55**, 277 (1970)
- 24) I. Lyon, R. K. Crane, Biochim, Biophys. Acta, **112**, 278 (1966)
- 25) R. K. Crane, G. Forstner, A. Eichholz, Biochim, Biophys. Acta, **109**, 467 (1965)
- 26) Y. Toyoshima, Y. Kobatake, H. Fujita, Trans. Faraday Soc., **63**, 2828 (1967); H. Nozaki, Y. Toyoshima 生産研究, **20** (1968)

