

# ミトコンドリアとそのモデル化合物を用いた振動反応の研究

## A Study of Oscillatory Reactions Caused by Substances Existing in Mitochondria

平山 千尋<sup>\*1</sup>

芝切 大樹<sup>\*2</sup>

箱崎 琢也<sup>\*3</sup>

西村美紀枝<sup>\*4</sup>

秀島 武敏<sup>\*5</sup>

キーワード： ミトコンドリア, 振動反応, 電子伝達系, NADH

### 1. はじめに

#### 1.1 膜を介した酵素の振動反応

一般的な化学反応は時間と共に反応物が減少し、生成物が増加する。その後、時間が経過しても双方の量に変化が起きない平衡状態になる。平衡状態から離れた非平衡状態において、非線形・開放系（絶えず物質が入ってきては出て行く系）になると、反応物・生成物の濃度が時間と共に相互に増加、減少を繰り返すことがあり、これを振動反応とよぶ。生体は非線形・開放系の状態にあると考えられる。生体内には細胞膜や細胞小器官を包んでいる膜が存在し、物質の出入りがある。

この膜の簡単なモデルとして、透析膜などの半透膜を用い酵素反応を膜で介すると、振動反応が起こることがわかった。たとえばカタラーゼと過酸化水素を半透膜を介して反応させると、溶存酸素量が振動する反応が起こる<sup>1)</sup>。さらにその他の多くの酵素でも振動反応が起こることを確認した<sup>2)</sup>。またカタラーゼをリポソームで包み、同様の実験も行い振動が確認できた<sup>3)</sup>。一方コンピュータシミュレーション<sup>1)</sup>により基質の浸透速度、生成物の排出速度と酵素反応の速度定数との適当な組み合わせにより、振動反応が起こることが

---

\*1 HIRAYAMA, Chihiro 東北大学大学院 多元物質科学研究所 修士課程

\*2 SHIBAKIRI, Daiki 桜美林大学リベラルアーツ学群 化学専攻2015年度卒業研究生

\*3 HAKOZAKI, Takuya 桜美林大学リベラルアーツ学群 化学・生物学専攻2015年度卒業研究生

\*4 NISHIMURA, Mikie 桜美林大学教育支援課 化学

\*5 HIDESHIMA, Taketoshi 桜美林大学自然科学系

わかっている。したがって、膜が介在する反応が多い実際の生体内でも、このような振動反応が起こっている可能性があると考えられる。そこで実際の生体膜を用いても振動反応が起こるかどうか調べることにした。試料としてミトコンドリアを用い、ミトコンドリア膜を介しての振動反応を調べた。

## 1.2 ミトコンドリアについて

ミトコンドリアは、ほぼすべての真核生物の細胞に存在する細胞小器官（オルガネラ）であり、生体のエネルギー源であるATPを好气的条件で生成する主要部分である。ミトコンドリアは外膜とよばれる膜に覆われ、またATP生成に重要な部分であるマトリックスは内膜にも覆われているため、二重の生体膜に覆われている。

食事等で得られたデンプンは、グルコースまで分解されて体内に吸収され、全身の細胞に届けられる。各細胞の細胞質において、グルコースは解糖系においてピルビン酸まで分解される。その際、1分子のグルコースは最終的に2分子のピルビン酸に変化する。好气的条件下では、ミトコンドリア外膜を解糖系で生成されたピルビン酸が通り、アセチルCoAに変換される。この時の反応経路は次のように考えられている。ピルビン酸は膜を透過できないので、膜に存在するピルビン酸運搬体（MPC）がピルビン酸を膜内に運び入れる。膜内に入るとピルビン酸はCO<sub>2</sub>を失い、残った2個の炭素原子がアセチル基として補酵素A（CoA）、NAD<sup>+</sup>と反応し、アセチルCoAとなる。生成したアセチルCoAは、ミトコンドリア内のマトリックスのクエン酸（TCA）回路に組み込まれていく。

クエン酸回路はアセチルCoAが入ることで反応が始まる。クエン酸回路の途中段階で、電子伝達体NADH、FADH<sub>2</sub>が生成される。

ATP生産に必要な自由エネルギーは、NADHとFADH<sub>2</sub>を電子伝達系で酸化して得られる。電子伝達系は4種のタンパク質複合体からなり、電子は標準還元電位の低い方から高い方、すなわち複合体Iと複合体IIから補酵素Q（CoQ）を経て複合体IIIへ、さらにシトクロムcを経て複合体IVに伝達される。CoQは呼吸生物に広く分布しユビキノンともいわれる。シトクロムcは水溶性のタンパク質で、膜周辺に存在する。

複合体IはNADHデヒドロゲナーゼやNADH-CoQレダクターゼとよばれ、CoQによる還元型NADHの酸化を触媒する。



複合体IIはコハク酸デヒドロゲナーゼやコハク酸CoQレダクターゼとよばれ、コハク酸からCoQに2つの水素と電子を渡す。

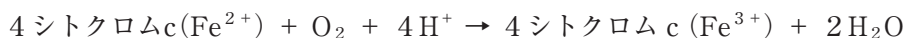


複合体IIIはシトクロムbc<sub>1</sub>やCoQ-シトクロムcレダクターゼとよばれ、シトクロムcによる還元型CoQの酸化を触媒する。



複合体IVはシトクロムcオキシダーゼとよばれるもので、O<sub>2</sub>（電子伝達系の最終受容体）

による還元型シトクロム c の酸化を触媒する.



このような電子伝達体の反応により,  $\text{H}^+$ が生じ膜間腔に移動する. このようにして膜間腔と内膜にプロトン勾配ができる. そして複合体Vでは, 内膜にあるATPシンターゼがもつプロトンチャネルを通して, プロトン ( $\text{H}^+$ ) がマトリックスに逆流することでATPが合成される.

### 1.3 研究の目的

ミトコンドリアの振動については, すでに多くの研究<sup>4)</sup>が行われているが, この研究では, 膜を通過する際に反応が振動するという我々の研究を踏まえて, この立場から振動反応を捉えなおすため次の3つの実験を行った.

- (1) ピルビン酸の半透膜透過に伴うアセチルCoAの振動反応
- (2) 半透膜を用いた電子伝達系物質の振動反応
- (3) 実際にミトコンドリアを用いた振動反応

最初の(1)及び(2)において, 半透膜を用いて振動反応が起こることを確かめる. その後実際のミトコンドリア膜を用いても振動が起こることを確かめ, 半透膜法との関連を調べる.

## 2. 実験

### 2.1 実験 I ピルビン酸の膜透過に伴うアセチルCoAの振動反応

解糖系で生成したピルビン酸がミトコンドリア内へ流入し, アセチルCoAへ形を変える. ピルビン酸が膜を透過する際には, ピルビン酸運搬体 (MPC) というタンパク質が働いている. ピルビン酸は膜を透過したあと, ピルビン酸デヒドロゲナーゼにより $\text{NAD}^+$ , CoAと反応し, アセチルCoAに変化する. 当然, 膜を介した反応であるので, 振動反応が起こっているのではないかと考えられる. そこで, 伸介による生体膜透過を半透膜の透過という単純系に置き換えて実験を行った.

この実験では, ミトコンドリア膜にみたてた半透膜として透析膜を用い, ピルビン酸と $\text{NAD}^+$ , CoA及び酵素のピルビン酸デヒドロゲナーゼを用い, 半透膜を介した実験を行った.

#### <試薬>

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	シグマ-アルドリッチ社製
ピルビン酸ナトリウム	和光純薬工業社製
CoA	シグマ-アルドリッチ社製
$\text{NAD}^+$	オリエンタル酵母社製
オキサロ酢酸	和光純薬工業社製
クエン酸シンターゼ	シグマ-アルドリッチ社製
アコニターゼ	シグマ-アルドリッチ社製

### <測定方法>

図1に示したように2つのセルを用意し、2つのセルの間に半透膜を挟んだ。下方のセルには酵素であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ、補酵素としてCoA及びNAD<sup>+</sup>溶液を入れた。一方、上方のセルにはピルビン酸ナトリウムを入れた。測定する吸収波長を340nmに設定して、生成するNADHの吸光度を紫外可視分光光度計（島津UV-1800）で測定した。測定条件は次のとおりであった。

#### 上層の液

ピルビン酸ナトリウム（10mM） 1 mL

#### 下層の液

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ 100  $\mu$  L

CoA（1.0mM） 1 mL

NAD<sup>+</sup>（0.5mM） 1 mL

溶液はすべてトリス緩衝液に溶かし、pH 8 に設定した。

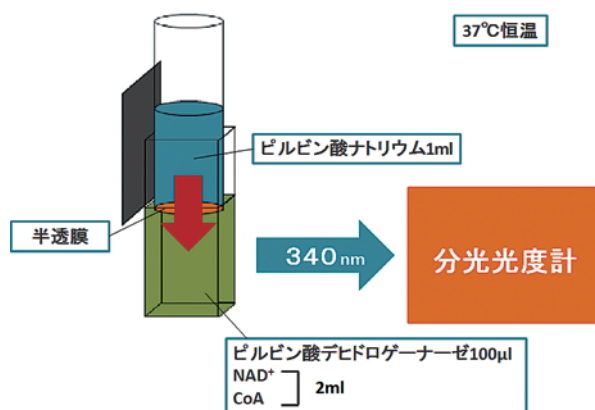


図1 測定装置図

膜を透過したピルビン酸がCoA及びNAD<sup>+</sup>と反応し、アセチルCoAとNADHが生成される。

### <測定結果>

図2はNAD<sup>+</sup>及びCoA溶液の濃度を固定し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの濃度を変えて測定したものである。

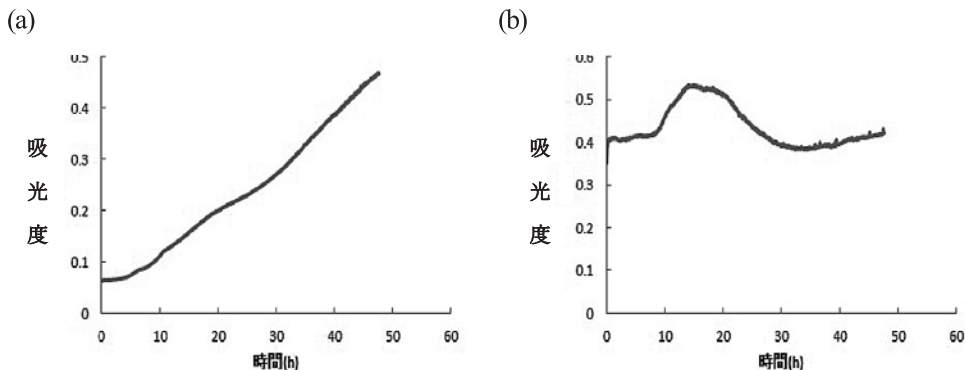


図2 NADHの振動反応, ピルビン酸デヒドロゲナーゼ濃度依存性  
 ピルビン酸デヒドロゲナーゼ濃度 (a)  $5.0 \times 10^{-3}$  mg/mL (b)  $6.25 \times 10^{-3}$  mg/mL

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ濃度が低いときは, NADH濃度は単調に増加するが, 濃度が高くなると, 周期は長いが振動が起こることがわかった. そこでピルビン酸デヒドロゲナーゼ濃度を  $6.25 \times 10^{-3}$  mg/mL で固定し, ピルビン酸の濃度を変化させる実験を行った. 図3はその結果である.

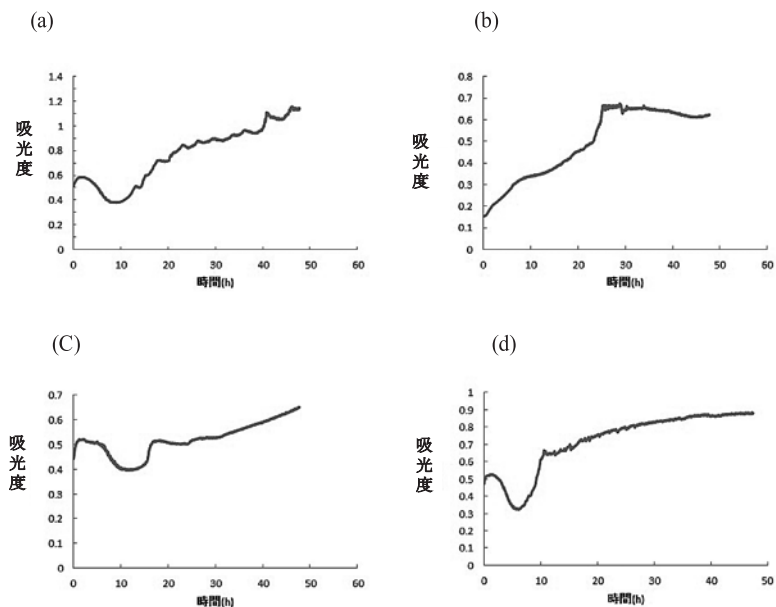


図3 NADHの振動反応におけるピルビン酸濃度依存性  
 ピルビン酸デヒドロゲナーゼ濃度:  $6.25 \times 10^{-3}$  mg/mL  
 ピルビン酸濃度 (a) 4 mM (b) 2 mM (c) 1.5 mM (d) 1.2 mM  
 その他の条件は図2と同じ

ピルビン酸濃度 4 mMでは振幅は小さいが、周期 3 時間程度の永続的な振動がみられた。ピルビン酸ナトリウムの濃度を下げていくと、周期が長くなる傾向になり、次第に振動はなくなった。

ミトコンドリアに入ったピルビン酸は、アセチルCoAに変化したあと、クエン酸(TCA)回路に入る。アセチルCoA濃度が振動することがわかったので、その後の反応も振動が引き続き起こっている可能性がある。そこで次のような実験を行った。図 3 の実験系にオキサロ酢酸、酵素としてアコニターゼとクエン酸シンターゼを添加し、測定する吸収波長を 340nmと240nmの 2 波長に設定して測定した。それぞれNADH及びcis-アコニット酸からイソクエン酸になる際の反応中間体であるcis-アコニット酸の吸収波長である。

図 4 は図 3 の実験系にオキサロ酢酸、クエン酸シンターゼ及びアコニターゼを加え調べたときの結果である。NADHの膜透過に伴うアセチルCoA生成反応からクエン酸回路の導入部である、

オキサロ酢酸 + アセチルCoA  $\Rightarrow$  クエン酸  $\Rightarrow$  cisアコニット酸  $\Rightarrow$  イソクエン酸  
にいたる反応を追跡した。測定条件は次のとおりであった。

#### 上層の液

ピルビン酸ナトリウム (10mM) 1 mL

#### 下層の液

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ ( $6.25 \times 10^{-3}$  mg/mL) 100  $\mu$  L

CoA (1.0mM) 1 mL

NAD<sup>+</sup> (0.5mM) 1 mL

オキサロ酢酸 (1 mM) 100  $\mu$  L

クエン酸シンターゼ (9.5mg/mL) 100  $\mu$  L

アコニターゼ (7.4mg/mL) 100  $\mu$  L

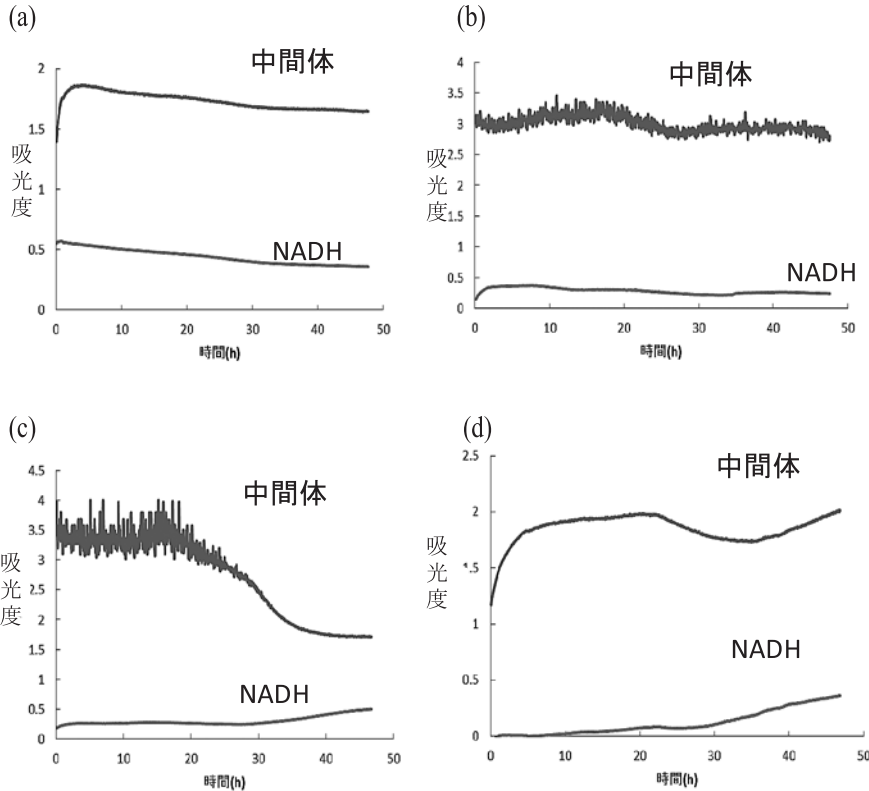


図4 NADHとcis-アコニット酸の振動反応  
 ピルビン酸濃度 (a) 10mM (b) 8mM (c) 4mM (d) 2mM

ピルビン酸濃度が10mMでは、測定した2日間ではNADHもcis-アコニット酸も振動が起こらず、単調に減少している。しかしピルビン酸濃度を下げていくと、次第にNADHの方は周期の長い振動がみられるが、中間体cis-アコニット酸の方は濃度が激しく振動していく領域があることがわかった。一方、図3のピルビン酸4mMのとき、アセチルCoA生成反応でみられたNADH濃度の周期の短い振動は消失し、周期の非常に長い振動が現れた。さらにピルビン酸濃度を下げていくと振動はなくなった。

#### <考察>

半透膜を用いてピルビン酸デヒドロゲナーゼを酵素として用い、ピルビン酸、 $\text{NAD}^+$ 及びCoAを反応させたときの様子を還元型のNADH濃度を測定して調べた。その結果、反応が振動することがわかった。実際のミトコンドリアでは、ピルビン酸は膜を透過できないので、膜内のタンパク質ピルビン酸運搬体が介在してピルビン酸を内膜の中に入れる仲介輸送である。この場合も濃度（化学ポテンシャル）が高い方から低い方へと物質は移動する。したがって半透膜を用いた反応は、生体膜が介在した反応のモデルとして適当である

と考えられる。濃度が高い方が膜透過速度は大きくなることはわかっている。透過速度を変えるには基質濃度を変化させればよい。この実験で、ピルビン酸濃度 4 mM付近で周期の短い振動が得られた。当然アセチルCoAも振動していると考えられる。

次にクエン酸回路への導入部であるオキサロ酢酸とアセチルCoAの反応からイソクエン酸までの反応まで振動が連動していくかどうかを調べた。その結果、NADHの振動は抑えられるが、クエン酸からイソクエン酸への反応の中間生成物であるcis-アコニット酸の濃度が激しく振動する領域があることがわかった。特に第1の実験で周期3時間程度の振動が得られたピルビン酸 4 mMの条件では、不規則であるが、短い反応中間体濃度の振動が30時間ほど続いた。最初のNADHの振動に連動して、今回調べたイソクエン酸までの反応も含めて、さらにクエン酸回路の全体反応が振動していくものと考えられる。

## 2.2 実験Ⅱ ミトコンドリアの電子伝達系モデル化合物を用いた振動反応の測定

実験Ⅱでは、ミトコンドリアの電子伝達系における振動反応の測定を行った。電子伝達系もまた膜を介した反応であるので、この場合にも振動反応が起こっている可能性がある。生体内電子伝達系の反応経路（複合体Ⅰ、複合体Ⅲ及び複合体Ⅳの反応）に存在するNADH、CoQ、シトクロムc、シトクロムcレダクターゼ及びシトクロムcオキシダーゼを用いて実験を行った。

クエン酸回路や解糖系で生成されたNADHも電子伝達系で利用されるが、それ自身はミトコンドリア内膜を透過できない。リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルという機構で、ミトコンドリアのマトリックス内でNAD<sup>+</sup>からNADHを生成している。膜外のNADH濃度が高いと、それに応じてシャトルを利用してマトリックス内のNADH濃度も増えるので、単純拡散の系として半透膜を用いたモデル実験も有効であると考えられる。

### <試薬>

シトクロム c	シグマ-アルドリッチ社製
エググレシチン	和光純薬工業社製
トルエン	和光純薬工業社製
CoQ10 (ユビキノン)	和光純薬工業社製
NADH	オリエンタル酵母社製
シトクロムcレダクターゼ	シグマ-アルドリッチ社製
シトクロムcオキシダーゼ	シグマ-アルドリッチ社製

### <CoQを含むリポソームの調整>

CoQは水に難溶性のためリポソームに閉じ込め使用することにした。リポソームとは脂質二重膜（人工膜）のことであり、生体膜のモデルとして使用される。油相にあるリン脂質分子が水相に入り込むと、疎水基同士が寄り集まり、頭部の親水基は水側を向く。これ



により球状の脂質二重膜ができる。今回の実験では油相（トルエン相）にあらかじめCoQを溶かし、リン脂質を油相から水相に移動させることによりリポソームを作成し、その際CoQをリポソーム内に閉じ込めることができる。この方法でリポソームが生成されるのはすでに確認されている<sup>3)</sup>。三角フラスコに水相、その上に油相を10mLずつ入れ、37℃の恒温槽に置き2日間放置した。その後、水相の部分のみを取り出した。リポソーム内にCoQは含まれているのか。それを検証するために、CoQを取り込んでいると考えられるリポソーム溶液の吸光度測定を行った。油相のみ取り出し、259nmの波長で吸光度を測定し、水相にあるCoQの濃度を評定した。CoQの初濃度5mMのとき、水相にはCoQが1.61mMあることがわかった。このことからCoQが油相から水相に移り、リポソーム内に含まれていることがわかった。

シトクロムcはリポソームが生成されても、水溶性のため膜内には閉じ込められないことがすでに確かめられている<sup>5)</sup>。CoQを閉じ込めたりポソーム及びシトクロムcを含んだ溶液を今後リポソーム溶液とする。

#### 水相

シトクロムc水溶液	0.2mg/mL
トルエン相	
エッグレシチン	3 mg/mL
CoQ	10mM

#### <測定方法>

セルを2つ用意し、上方のセルにはNADH、下方のセルにはCoQを閉じ込めたりポソーム溶液とシトクロムcレダクターゼを入れ、間にミトコンドリア内膜に見立てた半透膜(透析膜)をはさんで、図1の実験と同じ方法で分光光度計に入れ測定した。NADHは透過してCoQと反応し、さらにシトクロムcへと電子を伝達する。NADHの吸収波長である340nmと、還元型シトクロムcの吸収波長である550nmでの吸光度の時間変化を測定し、振動が起こるかどうかを調べた。測定条件は次のとおりであった。

#### 上層の液

NADH溶液	1 mL
--------	------

#### 下層の液

リポソーム溶液	2 mL
シトクロムcレダクターゼ (0.5mg/mL)	4 $\mu$ L

実験に用いた溶液はすべてトリス緩衝液でpH 8に設定した。

この実験系では3つの反応が起こる。第1の反応は、複合体Iの反応に相当するもので

あり、NADHがCoQを還元する反応である。2番目の反応は、還元型のCoQH<sub>2</sub>からシトクロムcに電子を伝達する反応であり、複合体Ⅲの反応に相当する。



最後の反応は、還元型のシトクロムcがシトクロムcオキシダーゼにより酸素と反応し、酸化型に戻る反応で、複合体Ⅳの反応に相当するものである。このようなモデル系を用いて振動が起こるかどうか確認した。

#### <測定結果>

最初にNADHとCoQの間に反応が起こるかどうか調べた。この時CoQはシトクロムcを含まないリポソーム溶液に溶かした。図5がその結果である。

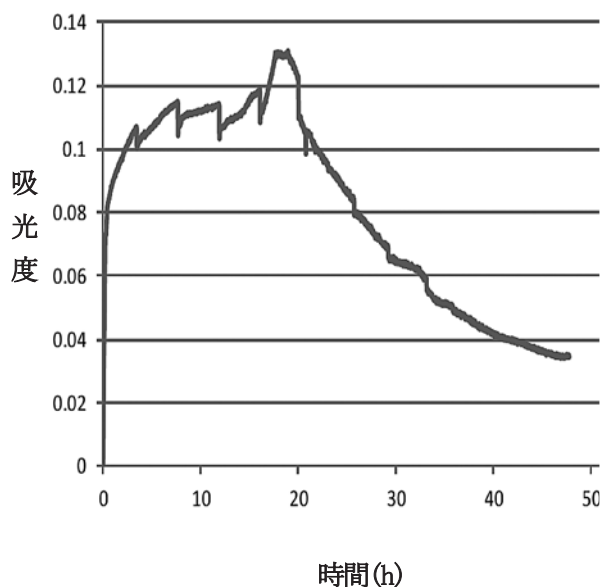


図5 NADHとCoQとの反応におけるNADH吸光度の時間変化

NADHが膜を透過し、リポソームに含まれたCoQとの間に、周期4時間程度の振動がほぼ1日起こり、その後次第にNADH濃度が単調に減少していき、NAD<sup>+</sup>濃度が増加することがわかった。

次にシトクロムcレダクターゼ添加した。この時、リポソーム及びシトクロムcレダクターゼの濃度を固定し、NADHの濃度を変化させる実験を行った。

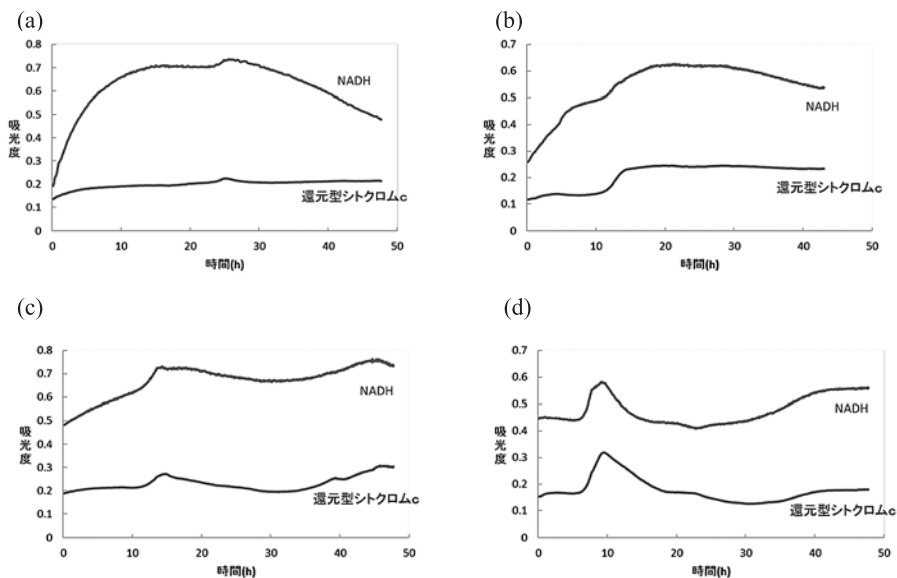


図6 NADH及び還元型シトクロムcの振動反応  
 NADHの初濃度は (a) 0.5mM (b) 0.4mM (c) 0.3mM (d) 0.2mM

図6のすべての条件において、最初340nmにおける吸光度が増加しているということから、なかなか反応せず、NADHの流入のみが起こっているように見える。しかしNADHの初濃度を下げることによって、NADH濃度の振動がよくみえてきた。NADH初濃度0.3mMの時に、周期が一番短い振動が現れた。シトクロムcの振動もNADHの振動とほぼ同期して現れた。

電子伝達系では、シトクロムcまで電子が渡された後、シトクロムcオキシダーゼにより再酸化される（複合体IVの反応）。そこで図6の実験系にシトクロムcオキシダーゼを添加した実験を次に行った。

前の実験と同じようにセルを2つ用意し、上方のセルにはNADH溶液、下方のセルにはCoQを閉じ込めたりポソーム溶液、シトクロムcレダクターゼ及びシトクロムcオキシダーゼを入れ、間に半透膜をはさんで分光光度計に設置した。NADHは透過してCoQと反応し、さらにシトクロムc、酸素へと電子を伝達する。NADHの吸収波長である340nmと、還元型シトクロムcの吸収波長である550nmでの吸光度の時間変化を測定し、振動が起こるかどうかを調べた。

測定条件は次のとおりであった。

上層の液

NADH溶液 (0.2mM)

1 mL

下層の液

リポソーム溶液

2 mL

シトクロムcレダクターゼ (0.5mg/mL)

4  $\mu$ L

シトクロムcオキシダーゼ

4  $\mu$ L

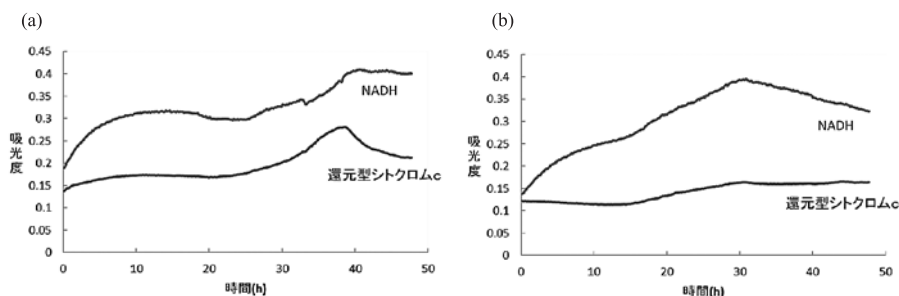


図7 シトクロムcオキシダーゼを添加したときの振動反応  
シトクロムcオキシダーゼ濃度 (a) 0.1mg/mL, (b) 0.01mg/mL  
その他の条件は図6と同じ

シトクロムcオキシダーゼを加えたところ、NADH、シトクロムcの振動の周期が長くなった。シトクロムcオキシダーゼの濃度を減少させると、振動が起こりにくくなった。

シトクロムcオキシダーゼは酸素を消費するが、今までの実験では酸素の供給はなく、最初にセルに入っている分の酸素しか消費できないため振動が起こりにくくなったと考え、酸素の供給を行うことにした。方法としてはカタラーゼと過酸化水素の反応により生成する酸素を利用することにした。カタラーゼと過酸化水素の反応では、



によって酸素が生成されることから、これを今回の実験に組み合わせることで、酸素の定常的な供給を図った。図7の実験系に過酸化水素(上層の液)100  $\mu$ L、0.1mg/mLカタラーゼ(下層の液)を添加した。

今回の実験では過酸化水素の濃度を変化させることで、振動反応にどのような変化がでるか観察を行った。

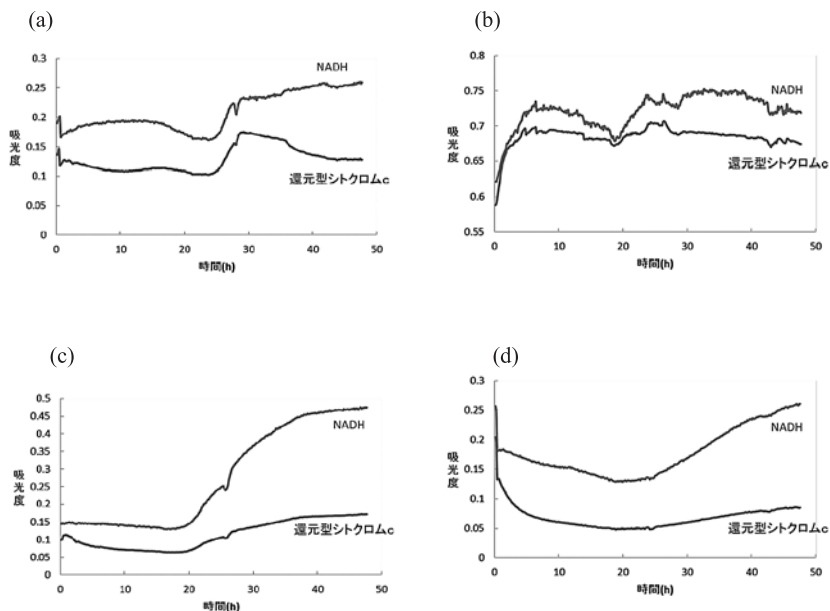


図8 カタラーゼ-過酸化水素反応を伴ったNADHと還元型シトクロムcの振動反応  
 シトクロムcオキシダーゼ濃度 0.1mg/mL  
 過酸化水素の初濃度は (a) 0.5% (b) 0.7% (c) 1.0% (d) 3.0%

酸素を供給することによって、細かく周期の短い振動が現れる領域 (0.7%付近) が見つかった。

### <考察>

解糖系で生じたNADHは電子伝達系で利用される。しかしNADHはミトコンドリア内膜を通過することはない。そこで実際には、リンゴ酸-アスパラギン酸シャトルにより膜内で $\text{NAD}^+$ からNADHができる。今回の実験は、NADHが半透膜を通過して膜内に入るという簡単なモデルにした。まず膜を通過したNADHが、リポソーム内に含まれているCoQと振動反応を起こしていることがわかった。さらに還元型の $\text{CoQH}_2$ からシトクロムcへ電子を伝達するときにも、振動が起こることがわかった。還元されたシトクロムcはシトクロムcオキシダーゼにより再酸化される。そこで今回の研究では、シトクロムcオキシダーゼを添加したときの反応を調べることにした。すでにシトクロムcオキシダーゼの代わりに還元型シトクロムcを酸化するものとして、硝酸レダクターゼと硝酸を加えたときに、NADHとCoQとの反応からシトクロムcの反応を経て硝酸レダクターゼの反応まで振動が連動して起こることを確かめている<sup>5)</sup>。今回は、電子伝達系で実際に使われているシトクロムcオキシダーゼを用いることにした。シトクロムcオキシダーゼの反応は酸素を必要とする。酸素を特別に供給しない系では振動を抑制するが、酸素を供給すると、周期の短い振動が得ら

れるようになった。酸素の供給法としてカタラーゼと過酸化水素の反応を利用した。カタラーゼと過酸化水素が膜を介して反応するようにしたので、酸素濃度の振動が起こり、それがシトクロムcオキシダーゼの反応に影響して振動が起きたのではないかと考えられるが、今回用いた過酸化水素の濃度では溶存酸素濃度は振動を起こさない条件であり、ある程度の時間が過ぎると、酸素の生成が定常的に起こると考えることができる。いままで周期の長い振動が現れていたのが、酸素を利用できる状態にしたシトクロムcオキシダーゼを添加したことにより、振動周期の短いものが得られたことは興味深いことである。

### 2.3 実験Ⅲ ミトコンドリアを利用した酸化的リン酸過程の振動反応

実験Ⅲでは、実際のミトコンドリアを用いての振動反応を測定した。測定の対象にしたものはNADHとFADH<sub>2</sub>であり、両方の物質ともクエン酸回路で生成され、電子伝達系で酸化され消費されるものである。

#### <試薬>

ピルビン酸ナトリウム	和光純薬工業株式会社製
硝酸マグネシウム六水和物	和光純薬工業株式会社製
ヤヌスグリーン	和光純薬工業株式会社製
過酸化水素 30%	和光純薬工業株式会社製

#### <ミトコンドリアの単離>

1回の操作では市販の牛肉約200mgを使用し、BioChain社製 Mitochondria Isolation Kit for Tissue and Cultured Cellsを使用し、手順に沿って操作を行った。その際遠心分離機を使用した。キットに沿ったすべての操作を終えた後、ヤヌスグリーンを用いてミトコンドリアを染色した。図9に示すように青色に染色されたのでミトコンドリアの単離ができていることを確認できた。

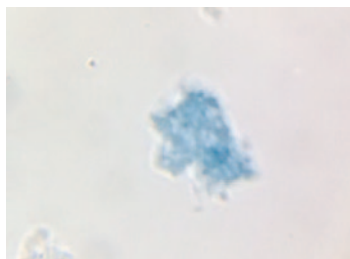


図9 ヤヌスグリーンで染色したミトコンドリア

### <測定方法>

クエン酸回路ではNADH, FADH<sub>2</sub>が生成され, 電子伝達系ではこれらの物質は酸化され消費される. 両方の反応経路ともミトコンドリア内で行われる. この実験では, NADH, FADH<sub>2</sub>の振動反応の測定を試みた. NADHは340nm付近の励起波長の光を当てると, 460nm付近の蛍光波長の光を發し, フラビン類は455nm付近の励起光を当てると, 550nm付近の蛍光を發することがわかっている. これを利用し, 蛍光分光光度計で測定をした. 電子伝達系においては酸素が必要であるので, 過酸化水素を加えて生体内カタラーゼにより酸素を發生させることにした.

セルに0.01mol/Lピルビン酸ナトリウム溶液を1 mL入れ, Mg<sup>2+</sup>を加えたものに牛肉あるいは単離したミトコンドリアを入れた. このセルを蛍光分光光度計(島津RF-5300)に設置し, NADHの460nmにおける蛍光強度(励起光340nm)と, FADH<sub>2</sub>の560nmにおける蛍光強度(励起光455nm)をそれぞれ測定した. 溶液はすべてトリス緩衝液にてpH 8に設定した.

### <測定結果>

図10は単離したミトコンドリアをピルビン酸ナトリウム溶液の中に入れ, 過酸化水素なしの状態でのNADH及びFADH<sub>2</sub>による蛍光の時間変化を調べたものである.

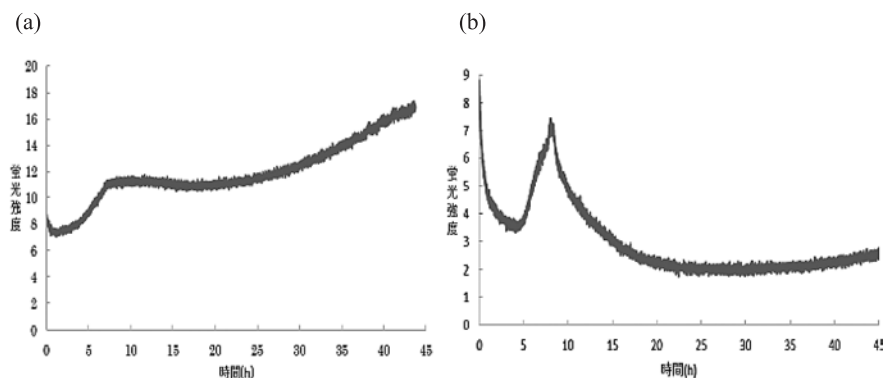


図10 単離ミトコンドリアを用いたときのNADHとFADH<sub>2</sub>の振動反応(過酸化水素なし)  
[ピルビン酸ナトリウム] = 0.01mol/L  
(a) NADH (b) FADH<sub>2</sub>

NADH, FADH<sub>2</sub>どちらも10時間以内に蛍光強度の極大値が得られる. NADHの方が先に極大となり, FADH<sub>2</sub>の方が少し遅れて極大となる. その後どちらも値が減少したあと, 少しずつ蛍光強度が増大していく. 周期の短い振動は得られなかった.

次に過酸化水素を添加した. 単離したミトコンドリアを用いて, 460nmの蛍光強度の時間変化を測定した.

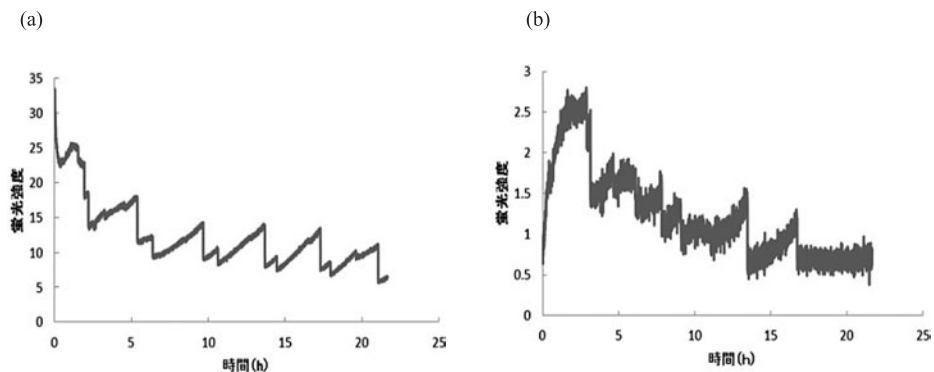


図11 図10の実験に過酸化水素を添加したときのNADHとFADH<sub>2</sub>の振動反応  
 [ピルビン酸ナトリウム] = 0.01mol/L, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.6%,  
 (a) NADH (b) FADH<sub>2</sub>

図11 (a) からわかるように、周期が約4時間の規則的な振動がこの実験では1日程度続いた。NADHの量が増えると蛍光強度が上がることから、この実験ではセル内のNADH濃度が周期的に増減していることがわかる。

次に550nmの蛍光強度の時間変化を調べた(図11 (b))。NADHと同様、単離ミトコンドリアの実験では、セル内のFADH<sub>2</sub>濃度も増減していることがわかった。振動の周期は約2時間だった。

生体内ではミトコンドリアは細胞質の中に存在しているため、単離された状態では存在しない。そのため、ミトコンドリアが細胞質に囲まれている状態である牛肉の方が、より生きた状態に近いと考えられることから、牛肉を用いた実験も行った。実験条件はミトコンドリアの場合と同じである。

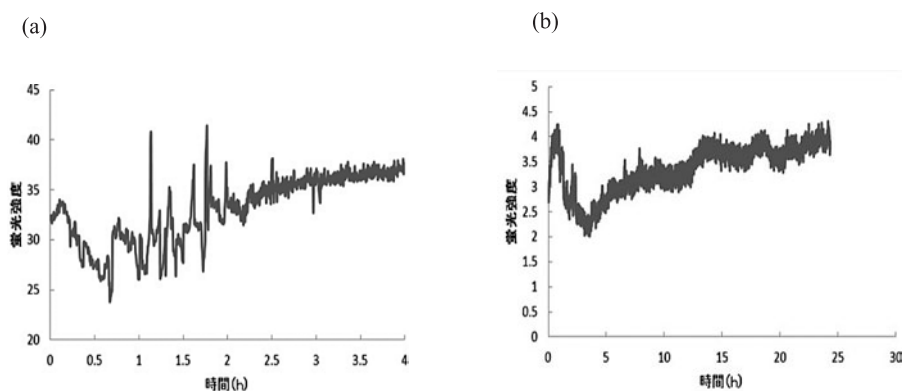


図12 牛肉を用いた場合のNADHとFADH<sub>2</sub>の振動反応 (a) NADH (b) FADH<sub>2</sub>



図12 (a) は、牛肉を用いたときのNADHの濃度変化を蛍光強度測定により調べたものである。開始後3時間以内に不規則ではあるが振動がみられ、その後単調に蛍光強度が上がっていった。

一方、図12 (b) に示すFADH<sub>2</sub>の場合にはNADHと同じように、次第に振動を伴い蛍光強度が強くなった。振動はNADHよりも長く続いた。

### <考察>

単離したミトコンドリアをピルビン酸の溶液に入れると、中間生成物であるNADHとFADH<sub>2</sub>の濃度が振動することがわかった。ピルビン酸が膜を透過しミトコンドリア内で反応が起きたことになる。実験Iで示したように、半透膜を介した実験で、ピルビン酸膜透過に伴う振動反応が起きたが、それだけではなく実際の生体膜を用いた実験でも振動が起こることを確認できた。ピルビン酸はミトコンドリアの外膜及び内膜を通り反応し、その反応生成物はクエン酸回路へと導入されていく。クエン酸回路でNADHとFADH<sub>2</sub>が生成される。実験Iの結果からクエン酸回路のそれぞれの反応も振動していると考えられるなら、生成物であるNADHとFADH<sub>2</sub>も振動するはずである。この実験結果はこのことを反映しているのかもしれない。しかしNADHとFADH<sub>2</sub>は次の電子伝達系（呼吸鎖）では電子伝達体として働き、消費され、それぞれ酸化型のNAD<sup>+</sup>とFADに変わる。振動がそこまで伝わっていくと考えるなら、この実験結果は全体の反応を含めたものとなる。今回、酸素を供給する手段として最後に過酸化水素を添加した。その結果、規則的な振動が得られた。過酸化水素を添加しないときには、このような周期の短い規則的な振動は得られず周期の長い振動であった。酸素を供給することによってこのような規則的振動反応が起こったことは、酸素を必要とするシトクロムcオキシダーゼの反応が行われていることがわかる。このことは、実験IIにおいて酸素を供給することによってシトクロムcオキシダーゼの働きを活性化させた結果と一致している。

また牛肉を用いた測定も行ったが、振動が起こることが確認された。ピルビン酸がミトコンドリア膜内に入り、その後の反応において振動が起こり、ミトコンドリアの外にもその反応が影響していることが考えられる。

### 3. 最後に

この研究の最終的な目的は、実際の生体膜を用いて振動反応が起こるかどうかであった。単離したミトコンドリアを用いてNADHとFADH<sub>2</sub>の振動反応を確認した。ピルビン酸がミトコンドリア内膜を透過し、アセチルCoAに変化し、クエン酸回路、電子伝達系へと続いていく間に振動が続いていくことがわかった。

モデル研究として半透膜を用いた実験も行った。ピルビン酸の膜透過に伴う反応が起こり、それがクエン酸回路へと続いていくことが示唆された。また電子伝達系のモデル実験

においても振動が起こることが確認された。実際の生体膜を用いても振動反応が起こることがわかったので、このようなモデル実験が実際の生体内反応を調べるのに有効であると考えることができる。

ミトコンドリアでは最終的には生物のエネルギー源であるATPが生成される。そこでATPの振動反応が起こっているかどうか、今後の課題ある。

#### 4. 参考文献

- (1) T. Hideshima & T. Inoue, *Biophys. Chem.*, 63, 81 (1997)
- (2) 秀島武敏著, 非平衡系の科学VI 生体の振動反応, 講談社サイエンティフィク (2002)
- (3) T. Hideshima & Y. Kato, *Biophys. Chem.*, 124, 100 (2006)
- (4) B. Hess, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 364, 11 (1983)
- (5) 黒澤智也, 千葉大学大学院自然科学研究科修士論文 (2006)

#### 要約

多くの酵素反応が、半透膜のような膜を挟んで酵素と基質を別々の溶液にしておくと基質のみが膜を透過したのち酵素と反応し、生成物濃度が振動することがわかっている。実際の生体膜を用いても振動反応が起こると考え、ミトコンドリアを用いて測定を行った。単離したミトコンドリアをピルビン酸の溶液内に入れると、ATP合成まで反応過程の中間体であるNADHやFADが振動を起こすことがわかった。一方、ミトコンドリア内物質のモデル化合物を用いて半透膜を利用した実験も行い、TCA回路及び電子伝達系の部分の振動反応を確認できた。半透膜を用いた実験でも実際の生体内反応を研究するのに有効であることが確認できた。