HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響
Author(s)	竹原, 一郎
Citation	低温科學. 生物篇, 25, 155-158
Issue Date	1967-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17731
Type	departmental bulletin paper
File Information	25_p155-158.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

短　　報

Ichiro TAKEHARA 1967 Effect of Freezing on the ATPase in Red Cell Membranes of Rabbit. *Low Temperature Science, Ser. B, 25.*

ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響*

竹　原　一　郎
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和42年9月受理)

生物材料が凍害を受ける機構を知る為には，凍結によって，どの部分にどの様な変化が生じたかを明らかにする必要があろう。これまでの実験では，個体，組織，細胞など複雑な材料を用いることが多かった。複雑な構造をもった材料を用いる限り，そこに起るであろう小さな変化を見出し，全体との関連を求めることは非常に困難なことと思われる。一方，精製した蛋白質を用いての実験もやられているが，その結果から，直ちに複雑な生体内でも，同様の変化が起るとは言い難い。凍害の機構を知る為の実験材料としては，できるだけ構造が単純で，しかも構成分のすべてが分っており，且できるだけ生体に近いものが最も望ましいと思われる。

この実験に用いた血球膜の構造も勿論単純なものではないし，又血球のそれと全く同じものとは言えない。しかし，多くの研究から明らかなように，無機イオンに対する透過性など正常の血球に非常に近いものであることも知られており[1,2]，その蛋白構成分に就いては未だ十分明らかではないが，近年徐々にその研究も進められている[3-5]。又生物材料の凍害の研究で細胞膜の重要性は古くからよく知られているところであり，血液に対する凍結の影響に関しては，今までに数多くの仕事がなされてきている。

以上の諸点から，生体のモデルとして，又精製した蛋白質よりは生体に近い材料として血球膜を取り上げ，血液での凍結に対する研究と比較しながら，血球膜の幾つかの酵素や，その他の蛋白構成分に対する凍結の影響を，形態の変化と合せて調べて行きたいと思う。又同時に，血球膜の蛋白構成分の解明にも役立てばと考えている。この報告は，以上の観点から始めた研究の予備的実験の結果である。

血球膜は Dodge 等の方法[6] に従って調製し，ATPase 活性は Post 等の方法[7] で測定した。反応混液は ATP 5 μmole, MgCl 5 μmole, NaCl 80 mmole, KCl 33 mmole, ヒスチジン・イミダゾール緩衝液 (pH 7.2) 100 μmole, 血球膜浮遊液 0.5 ml を含み，全容量 2.5 ml であり，反応温度は 37°C であった。ATPase 活性は，血球膜の乾燥重量 mg 当り1時間に遊離する無機燐の γ 数で表わした。なお，ここでの ATPase 活性は Na^+, K^+-independent と dependent なものを合せて測定したものである。又 Na^+, K^+ の至適濃度の検討も未だなされ

* 北海道大学低温科学研究所業績　第884号

第1表 凍結温度と ATPase 活性

凍結温度 (°C)	0	−5	−10	−20	−196
ATPase 活性* (γ/mg/hr)	27.8	14.9	14.5	19.3	31.5
	18.9	9.6	13.8	14.5	19.4
	20.0	11.6	11.9	15.8	22.9

* 血球膜乾燥重量 mg 当り，1時間に遊離する無機燐の γ 数，以下同様

ていない。

凍結は血球膜浮遊液* 0.5 ml を試験管にとって，−5，−10，−20°C のアイス・ストッカーに入れて行ない，その温度に一夜（約15時間）放置後，37°C の温水で融解，直ちに活性を測定した。液体窒素での凍結の場合は，同じく 0.5 ml の浮遊液を試験管にとって，振盪しながら液体窒素に浸し，発泡が止ってから2分後に，37°C の温水中で融解，活性を測定した。

第1表は ATPase 活性と凍結温度との関係を示す。−5 と −10°C での凍結によって活性は最も低下し，凍結しない場合の活性の 50～60% になった。これに対し液体窒素温度での凍結では，やや活性化される傾向を示した。−20°C での凍結の場合，この表では 20～30% 活性が低下しているが，血球膜浮遊液によっては活性の低下が殆んど起らない場合も多くみられた。顕微鏡での観察によれば，−20°C で凍結融解した血球膜浮遊液には血球膜の元の形態は全くと言ってよい程残っておらず，氷に押しつぶされたように，互にくつ付き合い，紐のようになった像が多く見られた。−10°C での凍結融解後では，紐状の像よりはむしろ互に寄り集って塊を作っているものが多く，そうなったものには元の形態は認められなかった。しかし，凍結前の形態に可成り近いものも僅か認められた。−5°C での凍結融解では，互に集って作る塊は −10°C の場合より小さく，凍結前の形態を保っているものの数も多く，又収縮してしまって元の形態は残っていないが，塊を作らないものの数も多く認められた。又一方，液体窒素温度で凍結融解した場合には，個々の血球膜は収縮して小さくなり，互にはばらばらで塊を作っていない像が殆んどであった。これら顕微鏡観察の結果は，正に夫々の温度での凍結の状態を

第2表 凍結に対するグリセリン及び蔗糖の保護効果

凍結温度 (°C)	0	−5	−10	−20	−196
ATPase 活性 (γ/mg/hr)	5% グリセリン*				
	21.6	17.9	23.8	20.4	21.8
	5% 蔗糖*				
	23.2	20.4	17.2	21.4	17.5

* 血球膜浮遊液を凍結する時の濃度を示す

* 浮遊液は 20 milliosmolar 燐酸緩衝液 (pH 7.4)，又は 10 mM ヒスチジン・イミダゾール緩衝液 (pH 7.4) である。なお，310 milliosmolar の濃度が血球と等張である。

示すものであろう。又この観察と第1表の結果は，凍結前の形態を残していることと，ATPase 活性を保持していることの間に全く関連の無いらしいことを示している。しかしながら，5% グリセリンや蔗糖は凍結による ATPase 活性の低下を殆んど完全に保護する（第2表）。この場合，血球膜の形態も凍結前後で全く変化が認められず，この結果からは，保護物質のない場合とは反対に ATPase 活性と形態の保持との間に密接な関係があるように見える。なお 5% DMSO を加えた場合も，ATPase 活性が全体として低下する以外は同じ保護効果を示した。

形態と ATPase 活性の関係を更に調べるために，超音波で血球膜を完全に壊した後で，ATPase 活性に対する凍結温度の影響をみた。超音波処理だけでも活性は低下するが，−5 及び −10°C の凍結で更に活性の低下が見られ，未処理の血球膜の場合と同じ傾向を示した（第3表）。なお，−5, −10, −20°C での凍結融解後，均一だった超音波処理の血球浮遊液に変性した蛋白質と思われる不均一な部分が生じた。しかし液体窒素温度での凍結では均一なままであった。又グリセリンを添加すると −5～−20°C での凍結後も，その浮遊液は均一なままであった。

次に凍結時間と ATPase 活性の関係を調べた。第4表には −5°C におけるその関係を示す。凍結後約15時間でその活性は最低に達するようである。ミオシン B の ATPase 活性の

第3表　超音波処理の ATPase 活性と凍結温度

凍結温度 (°C)		0	−5	−10	−20	−196
ATPase 活性 (γ/mg/hr)	未処理	19.2	9.4	8.0	15.1	18.8
	超音波処理	11.8	6.5	5.7	10.6	11.8

第4表　−5°C での凍結時間と ATPase 活性

凍結時間 (時)	0	1	2	4	8	15	23	48
ATPase 活性 (γ/mg/hr)	22.2	13.3	13.3	15.3	12.0	7.9	8.1	8.1

第5表　凍結温度を途中で変えた時の影響

凍結温度 (°C) 及び凍結時間* (時)	ATPase 活性 (γ/mg/hr)
0	20.8
−5 (6)	14.9
−5 (21)	3.3
−5 (6)→−20 (15)	13.2
−10 (6)	11.1
−10 (21)	8.8
−10 (6)→−20 (15)	14.3
−20 (21)	16.9

*　凍結時間はカッコ内の数字で示す

場合は凍結によって短時間内に活性の低下が起ってしまうことが報告されているが[8]，この膜ATPaseではその活性が最低になるまでは可成りの時間を必要とするように思われる。このことは第5表からも明らかである。即ち，−5及び−10°Cに6時間置いた後で−20°Cに移したものでは，その後活性は殆んど変化せず，−5及び−10°Cにずっと置いてあったものに比べて活性の低下は大きくなかった。

そのほか−5°Cの過冷却状態で長時間(20～24時間)置いたものでも，凍結の場合に比べて僅かではあるが，活性の低下が起った。又最初液体窒素温度で凍結してから，0，−5，−10，及び−20°Cに移して一夜放置した後のATPase活性は，初めから夫々の温度で凍結放置したものと全く同じ結果を示した。

以上の結果から，光学顕微鏡で観察された血球膜の外見上の形態とATPase活性の保持との間には余り密接な関係は無いように思われること。ATPaseの活性を最も低下させる温度範囲は比較的高い温度(−5～−10°C)であること。凍結温度のみでなく凍結時間も活性の低下に影響すること。過冷却でも活性の低下が僅かではあるが起ること等が分った。この様な活性低下の機構を明らかにするのは今後の問題であるが，これらの結果は最近幾つかの酵素で見出されている低温失活[9-11]を同じ様な機構で説明出来るかも知れない。

文　献

1) Teorell, T. 1952 Permeability properties of erythrocyte ghosts. *J. Gen. Physiol.*, ***35***, 669-701.
2) Hoffman, J. F. 1958 Physiological characteristics of human red blood cell ghosts. *J. Gen. Physiol.*, ***42***, 9-28.
3) Maddy, A. H. 1966 The properties of the protein of the plasma membrane of ox erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, ***117***, 193-200.
4) Mitchell, C. D. and Hanahan, D. J. 1966 Solubilization of certain proteins from the human erythrocyte stroma. *Biochemistry*, ***5***, 51-57.
5) Bakerman, S. and Wasemiller, G. 1967 Studies on structural units of human erythrocyte membrane. I. Separation, isolation, and partial characterization. *Biochemistry*, ***6***, 1100-1113.
6) Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J. 1963 The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, ***100***, 119-130.
7) Post, R. L., Merritt, C. R., Kinsolving, C. R. and Albright, C. D. 1960 Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, ***235***, 1796-1802.
8) Shikama, K. 1963 Denaturation of catalase and myosin by freezing and thawing. *Sci. Rip. Tohoku Univ., Biol.*, ***29***, 91-106.
9) Graves, D. J., Sealock, R. W. and Wang, J. H. 1965 Cold inactivation of glycogen phosphorylase. *Biochemistry*, ***4***, 290-296.
10) Penefsky, H. S. and Warner, R. C. 1965 Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. VI. Studies on the mechanism of cold inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, ***240***, 4694-4702.
11) Jarabak, J., Seeds, A. E., Jr. and Talalay, P. 1966 Reversible cold inactivation of a 17 β-hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: Protective effect of glycerol. *Biochemistry*, ***5***, 1269-1279.