



Title	ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響 II
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro
Citation	低温科学. 生物篇, 27, 161-164
Issue Date	1970-02-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17762
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p161-164.pdf



Ichiro TAKEHARA 1969 Effect of Freezing on the ATPase in Red Cell Membranes of Rabbit II. *Low Temperature Science, Ser. B, 27.*

ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響 II*

竹 原 一 郎

(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

前報¹⁾において、pH 7.2 磷酸緩衝液で作ったウサギの血球膜を凍結した時、その ATPase 活性が、凍結条件によって、どのような影響を受けるかを報告した。その後、ヒトの血球膜について、同様の実験をおこなったところ、血球膜を作る際の緩衝液の pH が 7.2 と 5.8 の場合で、凍結による ATPase 活性の変化に、大きな差の生ずることが分った^{2,3)}。ここでは、これと同じようなことが、ウサギの血球膜でもおこるかどうかを調べたので報告する。

血液は心臓穿刺により、血液の 1/4 量の ACD 液を含む注射器で採血した。血球膜の調製は、Dodge 等の方法⁴⁾に従った。血球は 0.9% 食塩水で数回洗い、白血球を出来るだけ除いた後、等張 (310 milliosmolar) の pH 5.8 磷酸緩衝液に浮遊し、冷蔵庫内に約 30 分放置。次いで、遠心分離した血球を、20 milliosmolar の pH 5.8 磷酸緩衝液で溶血後、同じ緩衝液で約 4 回洗滌した。こうして得られた血球膜を、更に、10 mM ヒスチジン・イミダゾール緩衝液 (pH 7.2) で約 3 回洗い、最後に、同じ緩衝液に浮遊して、採血した血液と大体同量の血球膜浮遊液を作った。この浮遊液を“pH 5.8-血球膜”と名付け、前報のそれを“pH 7.2-血球膜”と名付けて、両者を区別した。調製上での両者の違いは、最初の溶血と洗滌に用いた磷酸緩衝液の pH が 7.2 か 5.8 かという点だけで、他の操作は全く同じであった。pH 5.8-血球膜は、pH 7.2-血球膜と違って、かなりのヘモグロビンを含んでいるが、形態的にみて、両者の間に差は全く無かった。

凍結は、血球膜浮遊液 0.5 ml と 10 mM ヒスチジン・イミダゾール緩衝液 (pH 7.2)、あるいは、添加物質の溶液 0.5 ml を試験管にとって 1 ml とし、種々の温度のアルコール、あるいは、液体窒素に浸しておこなった。なお、液体窒素に直接浸す時は、発泡が殆んど止まるまで、試験管を振盪した。又、 -5°C での凍結は、植氷をする必要があった。凍結試料は、適当な時間の後に、約 40°C の温水中で振盪しながら融解し、直ちに、その ATPase 活性を測定した。

ATPase 活性の測定は、前報¹⁾同様、Post 等の方法⁵⁾によった。活性は、血球膜浮遊液 0.5 ml 当り、1 時間に遊離する無機燐の γ 数で表わした。従って、異なる血球膜浮遊液で得られた ATPase 活性の絶対値の間で比較は出来ない。各活性値は、2 つの同一実験値の平均である。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1014 号

第 1 表 凍結温度と ATPase 活性

凍結温度* (°C)	ATPase 活性 ($\gamma/0.5$ ml/hr)**		凍結温度* (°C)	ATPase 活性 ($\gamma/0.5$ ml/hr)**	
	2 時間凍結	20 時間凍結		2 時間凍結	20 時間凍結
0 (未凍結)	38.2	26.4	-29	44.0	44.8
-5	28.8	22.0	-74	51.2	57.6
-10	27.6	29.2	-196	62.4	55.6
-22	39.2	43.6	-196 (S.F.)***	—	26.6

* アルコール及び液体窒素の温度

** 血球膜浮遊液 0.5 ml 当り, 1 時間に遊離する無機磷の γ 数, 以下同様*** 凍結の方法: -5° (2 時間) $\rightarrow -10^{\circ}$ (30 分) $\rightarrow -22^{\circ}$ (30 分) $\rightarrow -29^{\circ}$ (30 分) $\rightarrow -74^{\circ}$ (25 分) $\rightarrow -196^{\circ}$ (16 時間)

いろいろの温度で凍結した血球膜の ATPase 活性の変化を, 第 1 表に示した。 -5°C , および -10°C での凍結によって, 未凍結のそれに比べ, ATPase 活性の低下がみられたが, それ以下の温度での凍結では, 活性の増大がおこり, 凍結温度が低い程活性の増加が大きかった。一方, ウサギの pH 7.2-血球膜では¹⁾, -5° と -10°C で, 活性の低下が常におこり, -20°C では, 血球膜により, 活性低下のおこる場合と活性に変化の生じない場合があった。又, -196°C の凍結では, 活性の増減が殆んどみられなかった。ヒトの pH 5.8-血球膜では^{2,3)}, -5°C 以下の温度での凍結によって, 常に活性の増大のみがおこった。又, その活性増大の程度は, 今回調べたウサギのそれに比べ非常に大きく, -196°C 凍結の場合で, 未凍結のその 10~40 倍であった。ヒトの pH 7.2-血球膜では, どの温度での凍結によっても, 活性の変化が殆んどおこらない場合が多かった。

第 1 表の最後の結果 (-196°S.F.) が示すように, 緩慢凍結では, 最終凍結温度が -196°C でも, ATPase 活性の増加がおこらなかった。この結果は, 活性の増減に直接関係のあるのは, 最終温度ではなくて冷却速度であることを暗示している。これを確かめる為に, 血球膜浮遊液を, その温度を記録しながら, 直接液体窒素に浸して凍結し, 適当な温度に達した時, 速やかに融解して, その ATPase 活性を測定した。第 2 表に示したように, このような条件で凍結した血球膜の ATPase 活性は, 夫々の冷却速度, 凍結時間の差やその他の操作上の誤差を考慮するならば, 最終到達温度に関せず, 殆んど同程度増加したとみてよい。同様の結果は, ヒトの pH 5.8-血球膜でも観察されている^{2,3)}。これらのことから, 凍結による血球膜 ATPase 活性の増大は, 冷却速度に主として依存していると言ってよいであ

第 2 表 液体窒素で凍結した時の最終温度の影響

最終凍結温度* (°C)	ATPase 活性 ($\gamma/0.5$ ml/hr)	最終凍結温度* (°C)	ATPase 活性 ($\gamma/0.5$ ml/hr)
0 (未凍結)	35.2	0 (未凍結)	40.0
-6.5	46.4		
-14	51.2	-13	70.4
-26	46.4	-21	72.8
-39	54.4		
-54	58.0	-51	79.6
-84	58.8	-83	70.8
-123	60.8	-119	71.2
-196	59.2	-196	67.2

* 記録紙上で, 銅・コンスタンタン熱電対の起電力の表から算定した温度

ろう。

次に、 -196°C で急速凍結後、他の温度に移して、その活性に変化がおこるかどうかを調べた。第3表に示したように、 -196°C から他の温度にそのまま移した場合、その活性は、 -196°C から直接融解した血球膜のそれに比べ、やや増加する傾向を示した。しかし、 -196°C で凍結し、融解後再び -5° 、 -10° 、 -20°C で凍結すると、その活性は、未凍結の血球膜のそれに近い値まで低下した。

-196°C 凍結で一旦増大した ATPase 活性が、再凍結によって低下するのは、上に示した比較的高い温度ばかりでなく、 -196°C で凍結融解を繰返す場合にもおこった (第4表)。この場合、再凍結する前に5%グリセリンを添加しても、活性の低下を防ぐことは出来なかった。ウサギの pH 7.2-血球膜の場合には、 -196°C 凍結で活性は増大しないけれど、このような活性の低下もおこらなかった。又、ヒトの pH 5.8-血球膜では、最初の凍結融解で活性が高まった後凍結融解を繰返しても、その活性に殆んど変化はおこらなかった。

グリセリンは、再凍結による活性低下を防ぐ為の保護効果を殆んど示さなかったが、 -196°C での最初の凍結による活性増大を妨げることは出来た。第5表に示したように、グリセリン以外のものも、それと同程度の効果があった。ヒトの血球膜の場合に比べると、エチレングライコールやマンニットは、このウサギの場合非常に大きな効果を示した。

以上の結果から、ウサギの血球膜の場合も、ヒトのそれと同様、血球膜を作る時の pH の

第3表 -196°C から他の凍結温度に移した時の影響

凍結条件	ATPase 活性 ($\gamma/0.5$ ml/hr)	
	直接移動	融解後再凍結
未凍結	24.0	18.4
-196° のみ	57.2	53.6
$-196^{\circ} \rightarrow -5^{\circ}$	59.6	26.4
$-196^{\circ} \rightarrow -10^{\circ}$	63.6	22.4
$-196^{\circ} \rightarrow -23^{\circ}$	65.6	25.6

-196°C で5~10分間、移動或は再凍結後約1時間凍結

第4表 -196°C で凍結融解を繰返した時の影響

凍結条件	ATPase 活性 ($\gamma/0.5$ ml/hr)	
未凍結	26.4	
1回凍結	73.2	
3 "	34.4	
6 "	30.0	
10 "	29.2	
未凍結	28.0	
1回凍結	83.2	
3回凍結	{ グリセリン添加	34.4
	{ 無添加	32.0

第5表 凍結による ATPase 活性増大に対する各種化合物の影響

化合物 (最終濃度 5%)	ATPase 活性増大の程度* (%)
ブドウ糖	8
蔗糖	14
ソルビット	14
マンニット	4
グリセリン	7
エチレングライコール	3
ジエチレングライコール	14
トリエチレングライコール	5
ポリエチレングライコール	7
ジメチルスルフォキシド	6
無添加	100

* 無添加の対照を -196°C で凍結した時の ATPase 活性の増加を 100 とした場合の相対値。凍結は -196°C で約3分

違いによって、その ATPase 活性に対する凍結の影響に大きな差の生ずることが分った。しかし、ウサギとヒトの血球膜の間には、例えば、比較的高い温度での凍結による活性の増減や、 -196°C で凍結融解を繰返した時の活性の変化等、個々の点では大きな違いもあった。これらは動物の種による差の為であろう。Burger 等⁶⁾ は牛とヒトの血球膜の間で、その構造の安定性に大きな差のあることを述べている。再凍結によるウサギ pH 5.8-血球膜の ATPase 活性の低下は、多分、酵素それ自体の失活によるものではなくて、膜構造の安定性との関連でおこると考えているが、今後検討すべき問題である。

凍結による ATPase 活性増大の機構に関しては、ヒトの血球膜での結果について説明したように³⁾、凍結によって膜がこわれ、基質である ATP が膜の内面に存在する ATPase に近づき易くなる結果と思われる。

終りに、採血に御協力下さった浅田実氏に深謝する。

文 献

- 1) 竹原一郎 1967 ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響. 低温科学, 生物篇, **25**, 155-158.
- 2) Takehara, I. and Rowe, A. W. 1968 The freezing of human red cell membranes with reference to adenosine triphosphatase activity (5th Annual Meeting Abstract). *Cryobiology*, **4**, 256.
- 3) Takehara, I. and Rowe, A. W. 投稿準備中.
- 4) Dodge, J. T., Mitochell, C. and Hanahan, D. J. 1963 The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 5) 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.
- 6) Burger, S. P., Fuji, T. and Hanahan, D. J. 1968 Stability of the bovine erythrocyte membrane. Release of enzymes and lipid components. *Biochemistry*, **7**, 3682-3700.

低温科学生物篇 第 27 輯 訂正

頁	行		誤	正
11	英文タイトル	1	Freeze Drying	Freeze-Drying
15	下から	2	無糖	蔗糖
45	上から	6	<u>4</u>	<u>6</u>
64	下から	10	<u>4</u>	<u>6</u>
78	下から	16	林部	材部
110	下から	16	第 3 図	第 2 図
122	上から	2	Escherichia Coli	Escherichia coli
130	第 4 表		側芽	副芽
131	第 6 表		側芽	副芽
131	第 7 表		側芽	副芽
132	第 8 表		側芽	副芽
159	下から	7	Supercoold	Supercooled
159	下から	9	Supercoold	Supercooled
159	下から	11	低温化学	低温科学