



Title	ウサギ血球膜の凍結 : 血球膜に対するホスホリパーゼCの反応性
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro
Citation	低温科学. 生物篇, 28, 87-89
Issue Date	1971-01-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17774">https://hdl.handle.net/2115/17774</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p87-89.pdf



Ichiro TAKEHARA 1970 Freezing of Red Cell Membranes: Reactivity of Phospholipase C on Red Cell Membranes. *Low Temperature Science, Ser. B, 28.*

## ウサギ血球膜の凍結：血球膜に対する ホスホリパーゼCの反応性\*

竹 原 一 郎

(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

凍結によって、細胞膜がどのような傷害を受けるかを知るために、先に血球膜に対する凍結の影響を、ATPase 活性の変化を目安として調べた<sup>1-3)</sup>。その結果、ウサギとヒトの血球膜で多少様子は異なるが、pH 5.8の燐酸緩衝液で作った膜(pH 5.8-血球膜)では、冷却速度が増すに従って、ATPase 活性が高まることを見出した。しかし、凍結による膜の傷害が、血球膜の内面に局在すると考えられているATPase<sup>4,5)</sup>に、基質であるATPを近づき易くさせることを、この結果は推測させるに過ぎなかった。従って、このような実験から、溶血度をもって赤血球の凍結傷害の程度を調べた今までの多くの実験結果と比べ、特に新たな知見が得られることは期待し難い。我々の目的とするところは、細胞膜を構成している各成分の状態や、成分間の相互作用が、凍結によって、何らかの変化を受けるか、もし受けるならそれはどのようなものかを知ることである。

以下述べる実験は、血球膜にホスホリパーゼCを作用させた時、凍結によって、その反応性に差を生ずるかどうかを調べたものである。その結果によって、凍結による膜の状態変化、特にホスホリピッドのそれについて、何らかの推測を可能にするかも知れないと考えたのである。ホスホリパーゼCは、ホスホリピッドをデグリセライドと水溶性のホスホリル塩基に分解する酵素であり、ヒトの血球膜から、その燐の70%前後を遊離することが知られている<sup>6)</sup>。

この実験では、ウサギの血球から作ったpH 5.8-血球膜のみを用いた。この膜の調製は、前報<sup>3)</sup>同様、Dodge等の方法<sup>7)</sup>にしたがった。ホスホリパーゼCは、*Clostridium welchii* から調製された市販のものを、そのまま用いた(Sigma Chemical Co.)。反応混液は、血球膜浮遊液0.5 ml, 0.2 Mヒスチジン・イミダゾール緩衝液(pH 7.2) 0.5 ml, 50 mM CaCl<sub>2</sub> 0.1 ml, 適当な濃度の酵素液0.4 mlから成る。反応温度は25°Cで、反応は10%トリクロル醋酸1.5 mlを加えて止めた。上清に遊離した燐は、Bartlettの方法<sup>8)</sup>で定量した。酵素濃度が0.2 mg/mlのとき、25°C, 10分間の反応で、膜の燐の大部分は遊離され、60分までの間に徐々に最高値に達した。凍結は、血球膜浮遊液0.5 mlを試験管にとって、-10°Cのアイス・ストッカーに入れるか、液体窒素に浸して行ない、適当な時間の後、30°Cの水中で融解した。凍結前後の血球膜に対

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第1121号

第1表 凍結血球膜に対するホスホリパーゼCの反応

酵素濃度 (0.2 mg/ml × x)	遊離した 燐* (μg/ml)			
	未凍結	-10°C**	-196°C***	
			1 ×	× 3
1	9.18	11.61	—	11.52
	12.54	—	—	11.64
	13.11	—	15.51	—
1/2	2.91	2.97	—	4.19
	2.64	—	—	9.36
	1.95	—	4.44	—
1/3	1.86	1.92	—	2.85
	1.04	—	3.33	—
1/4	0.18	—	—	0.36

\* 25°C, 8分間に1 mlの血球膜浮遊液から遊離された燐

\*\* -10°Cのアイス・ストッカーで15時間凍結

\*\*\* 液体窒素に浸して凍結, 2分後, 30°Cの水中で融解。×3は同じ操作を3度繰返したことを示す

するホスホリパーゼCの反応性は, 種々の酵素濃度で25°C, 8分間に遊離する燐の値で比較した。尚, 各測定値は, 2つの同一実験の平均である。

第1表に示したように, 液体窒素の温度で凍結した膜では, 未凍結の膜に比べ, ホスホリパーゼCに対する感受性が高まっている。それは, 低濃度の酵素のとき, 特に著しい。この結果は, -196°Cでの凍結によって, 膜のホスホリピッドが酵素と反応し易い状態になったことを暗示しているように思われる。比較的高濃度の酵素の場合, 両者の差が小さくなっているが, それは反応時間内に, 大部分の燐(全燐の50~60%)が遊離してしまうためであろう。又, 充分時間反応させると, 凍結した膜と未処理の膜との差は全く認められなくなった。例えば, 酵素濃度0.2 mg/mlで, 25°C, 2時間反応させると, 未凍結の膜で18.78 μg, 液体窒素で1度凍結した膜で18.60 μgの燐が遊離した。これは膜の全燐の77~78%に相当し, これ以上の燐は, 反応時間をのばしても, 殆んど遊離してこない。

-10°Cで凍結した膜では, 未凍結の膜と比べ, その反応性に殆んど差は認められなかった。これらの結果は, pH 5.8-血球膜を-196°Cで凍結したとき, そのATPase活性が増大するが, -10°Cの凍結では余り変化が見られなかったこと<sup>3)</sup>と何らかの対応を示しているように思われる。又, 以上の結果から, -196°Cでの凍結によって, 膜のホスホリピッドの約3/4は, ホスホリパーゼCに対する感受性を増すような何らかの状態変化を蒙るが, 残りのものは全く影響を受けないことが分った。Singer等<sup>9,10)</sup>の膜のモデルに従えば, ホスホリピッドの25~30%は膜の蛋白質と固く結合しており, 残りのホスホリピッドとは異なる物理的状态にあるという。この考え方によれば, 凍結によって影響を受けるのは, その極性基が外側の水と接しているホスホリピッドであって, 蛋白質と結合している残りの部分は全く状態変化を蒙らないか, 或いは少なくとも蛋白質とホスホリピッドとの間の結合は影響を受けなかったものと考えられる。凍結によって, ホスホリピッドが受けたと考えられる状態変化が, どのようなものか現在のところ分らない。凍結によって膜の感受性が高まるのと同じ傾向の結果は, 血球膜を超音波で壊した時にも得られた。この場合, ホスホリパーゼCの反応性が高まるのは, この処理

によって、膜は小胞体又は細片になり<sup>5,11)</sup>、その結果として、基質であるホスホリピッドの濃度が高まった為と思われる。しかし、凍結によって、膜はそれ程ひどく壊れない。もし、ホスホリパーゼCに対する膜の透過性が凍結によって増すとすれば、その反応性の高まることを一応説明出来るが、我々の知る限りでは、その証拠はない。又、蛋白質と結合していないホスホリピッドの凡ての極性基が一様にホスホリパーゼCの近づき易い状態にあるのではなくて、凍結によって、より多くの部分が酵素と反応し易い状態に変わるのかも知れない。

終りに、採血に御協力下さった浅田実氏に感謝する。

#### 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) 竹原一郎 1969 ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響 II. 低温科学, 生物篇, **27**, 161-164.
- 4) Whittam, R. 1962 The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport. *Biochem. J.*, **84**, 110-118.
- 5) Marchesi, V. T. and Palade, C. E. 1967 The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase. *J. Cell Biol.*, **35**, 385-404.
- 6) Lenard, J. and Singer, S. J. 1968 Structure of membranes: Reaction of red blood cell membranes with phospholipase C. *Science*, **159**, 738-739.
- 7) 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.
- 8) Bartlett, G. R. 1959 Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468.
- 9) Lenard, J. and Singer, S. J. 1966 Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **56**, 1828-1835.
- 10) Glaser, M., Simpkins, H., Singer, S. J., Sheetz, M. and Chan, S. I. 1970 On the interactions of lipids and proteins in the red blood cell membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **65**, 721-728.
- 11) Rosenberg, S. A. and McIntosh, J. R. 1968 Erythrocyte membranes: Effects of sonication. *Biochim. Biophys. Acta*, **163**, 285-289.