



Title	膜電位の測定
Author(s)	伊藤, 繁
Description	4章 分光測定 7
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 567-572
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39194
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-078.pdf



7. 膜電位の測定

伊藤 繁¹⁾

光合成光反応は電子の動き（酸化還元反応に伴う電流）を膜内に作りだし、光合成膜系で仕切られた内外溶液相間に電位差（膜電位、 $\Delta\phi$ ）を生じる。これとは別に、酸化還元反応に伴う水素イオン（ H^+ ）の膜内外での消失と出現、膜を横切る動きが、内外溶液相間に H^+ 濃度差（ ΔpH ）を作り出す。 $\Delta\phi$ と ΔpH で変わる H^+ を動かす力（エネルギー差）は、 H^+ についての液相間での電気化学ポテンシャル差（ $\Delta\bar{\mu}_{H^+} = \Delta\phi - (RT/F) \cdot \Delta pH$ ）で表される。ATP 合成酵素は $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を消費して H^+ を動かし、分子を回転させ ATP 合成をする。ここでは 1. 膜電位と $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の発生と測定の原理、2. $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の解消と脱共役、3. 実際の測定例を解説する。

Measurement of membrane potential

Principles of formation of membrane potential in photosynthesis are reviewed. Photosynthetic electron transfer reaction forms the electrochemical potential difference of electrons, protons and ions across the membranes. Simple equations to understand the ion and electron movements in relation to membrane potential and membrane surface potential are shown. Methods for the measurements of membrane potential by using the carotenoid electrochemical bandshift and the ion distributions are interpreted with examples.

7.1 膜電位

7.1.1 膜電位と $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の発生と測定の原理

(1) なぜ細胞や葉緑体膜は閉じた袋状なのか？「化学浸透圧説の誕生」

光合成では光により電子やイオンが動く。電子の動きは、水を酸化したり、キノンや $NADP^+$ の還元をおこすが、これと同時に電流として電位差（電圧差）を作り出す。この溶液相間の電位差を膜電位 $\Delta\phi$ と呼ぶ。図 1 は、植物葉緑体やシアノバクテリア膜系内部での光合成電子移動経路を模式的に示す。光化学系 I と II 反応中心複合体内では、電子は内側から外側に向かって膜内を移動し、シトクロム b_6/f 複合体内でも電子は外側に向かって動く。全体としてみると電子の流れは絶えず外側に向かい、内側が正、外側が負の電位差 $\Delta\phi$ を生じる。これを electrogenic（電位差発生的）な電子の動きと呼ぶ。一方膜内での、プラストキノン酸化型（PQ）と、水素イオン（ H^+ ）を結合した還元型の（ PQH_2 ）の動きは電荷移動を伴わないので、 $\Delta\phi$ を変えない。光化学系 II での PQ の光還元反応、シトクロム b_6/f 複合体内での酸化還元反応、光化学系 I での $NADP^+$ の還元反応では膜内側への H^+ 放出、膜外側での H^+ 結合により、酸化還元反応全体とし

て電位が正にある膜内側に向かって、エネルギーに逆らって（能動輸送と呼ぶ）、 H^+ が運ばれる。

どうしてこのような方向で電子が移動するのだろうか？ まだ膜タンパク質の位置や構造が不明な時代に、P. Mitchell (1966¹⁾, 1968²⁾) は、「生体膜上の蛋白質は一定向きに配列され、光合成や呼吸電子伝達系は膜を横切り一方向のみに電子を動かし $\Delta\phi$ を増大させ、さらに H^+ を動かす。同じ膜上に並んだ ATP 合成酵素は、これと反対向きに水素イオンを動かし ATP を合成する」という「化学浸透圧説（chemiosmotic theory）」を提案した。この時期に急発展した生化学は、タンパク質一つ一つを精製し、分子レベルで調べることを目標としていた。蛋白質複合体を精製し、溶液中で混じり物のない状態での研究が可能になりつつあった。このような状況で「閉じた袋状の膜構造そのものに意味が有る」というこの提案は、大物生化学者たちとの間に、大論争を巻き起こした。私自身も英国での postdoc 時代に「Mitchell は気が狂っている」という反対意見をよくきいた。シンポジウムや学会ごとに会場挙げての熱い論争が 10 年以上つづき、これが光合成や呼吸などのエネルギー共役機構、膜構造、イオンや代謝産物の輸送、細胞膜の役割などについて、大きな研究発展をもたらした。この論争は、その後の生化学研究、特に光合成反応中心膜タンパク質の構造解析により、決着をつけられ、「化学浸透圧説」は生命現象の基礎概念の一つとして受け入れられた。

1) 名古屋大学 大学院理学研究科物質理学専攻物理 光生体エネルギー研究室

(2) 膜電位の発生と測定の原理：

化学浸透圧説は、閉じた袋状のエネルギー変換膜の内外溶液相間での H^+ の動きがエネルギーを伝達する実体であると提案し、実証された。溶液中のイオンは、濃度の低い方向への拡散力（濃度差に依存）と、その電荷に働く電氣的な力（電位差とイオン電荷に依存するクーロン相互作用）を受けて動く。従って、あるイオン種のモル自由エネルギー（電気化学ポテンシャル、 $\bar{\mu}_i$ ）を、その活量（ a_i 、ほぼ濃度に等しい）と価数（ z_i ）とその場所の電位（ ϕ ）で表すことができる。

$$\bar{\mu}_i = \bar{\mu}_i^\circ + RT \log a_i + z_i F \phi \quad (1)$$

$\bar{\mu}_i^\circ$ は一定の標準状態（ $\phi=0$, $a_i=1$ ）での $\bar{\mu}_i$ の値、 R はガス定数、 F はファラデー定数、 T は絶対温度、 $\log$ は自然対数である。イオンは $\bar{\mu}_i$ の差（エネルギー差）があると $\Delta\bar{\mu}_i$ のより小さい方へ移動させようとする力を受け、その動きで $\Delta\bar{\mu}_i$ 分の仕事がなされる。たとえば、葉緑体チラコイド膜の外液（o）と内液（i）間での pH 差が $\Delta pH_{(i-o)}$ 、電位差が $\Delta\phi_{(i-o)}$ の場合、 H^+ にかかわる電気化学ポテンシャル差は、

$$\Delta\bar{\mu}_{H^+} = \bar{\mu}_{H^+}(i) - \bar{\mu}_{H^+}(o) = -2.3 RT \Delta pH_{(i-o)} + F \Delta\phi_{(i-o)} \quad (2)$$

で表される。 H^+ の動きで $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ に応じたエネルギーが得られる、あるいは H^+ を動かすには $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 分のエネルギーを要する。この式から、同量の H^+ が動いても、得られる

エネルギーは ΔpH 、 $\Delta\phi$ に依存して変わることがわかる。室温 300 K では $2.3 RT/F = 60 \text{ mV}$ なので、1 ΔpH は約 60 mV の $\Delta\phi$ に相当する。 $\Delta\phi$ の変化は水素イオン以外の全イオンの動きにも同時に影響する。今、イオン X の平衡を考えると、

$$\Delta\bar{\mu}_X = \bar{\mu}_{X(i)} - \bar{\mu}_{X(o)} = 2.3 RT \cdot \log(C_{(i)}/C_{(o)}) + z_i F \Delta\phi_{(i-o)} \quad (3)$$

C はイオン濃度。電気泳動でよく見られるように、 $\Delta\phi$ に従ってイオンは動く。逆にイオンの分布と $\Delta\bar{\mu}_X$ がわかれば $\Delta\phi$ を算出できる。もう一つ大事な事は、膜透過性のないイオンにはこれは関係ない（膜透過性に依存する）。従って、チャンネルタンパク質や後述のイオノホアなどで特定イオンの膜透過性を変えると、電子移動や他イオンの動きできる $\Delta\phi$ に応じてそのイオンが動き、これがまた $\Delta\phi$ や $\Delta\bar{\mu}_X$ を変える。生体膜は $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の積極的な形成（電子移動やイオンの能動輸送）と、イオン種ごとの透過性の違い、イオン間の共役関係をうまく制御して ATP 合成やイオン輸送を行い、細胞内環境や代謝産物の移動をうまく制御している。 $\Delta\bar{\mu}_X$ に従うイオンの動きを受動輸送、逆らう輸送を能動輸送という。

逆に膜を横切る物質の動きはエネルギーの変化をとまなう。この関係を利用してエネルギー共役（たとえば、電子伝達反応と ATP 合成反応間でのエネルギーの交換）が行われる。電子伝達系は電子を膜中で動かし、 $\Delta\phi$ をつくり、同時に膜外と中での H^+ 量をかえる。 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を

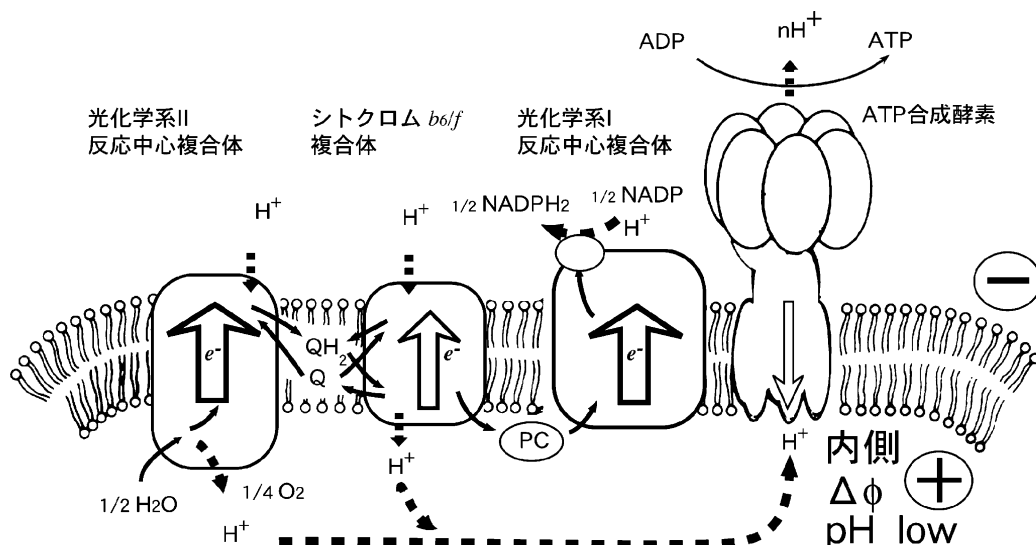


図1：葉緑体チラコイド膜上の電子伝達系とATP合成酵素の働きによる $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 、 $\Delta\phi$ 、 ΔpH の生成と解消。光化学系IとII反応中心複合体内とシトクロム b_6/f 複合体中での膜外向きの電子の動き（白矢印）が内側が正の向きに $\Delta\phi$ を形成する。電子伝達反応に伴い H^+ は膜外側で吸着され、内側で放出される。こうして作られた $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ がATP合成酵素で H^+ を膜外側へ動かし、ATP合成を駆動する。 H^+ の電荷は電子と違い正なので、外向きに動く $\Delta\phi$ は減少し（ATP合成酵素内部の細い白矢印）、同時に ΔpH も減少する。

利用した ATP 合成酵素による ATP 合成では以下の式が実現されると期待される。

$$n\Delta\bar{\mu}_{H^+} = \Delta G_p^0 + 2.3 RT \log(ATP)/(ADP)(Pi) \quad (4)$$

n は 1ATP 合成に必要な H^+ の個数, ΔG_p^0 は ATP 合成に伴う標準 Gibbs 自由エネルギー変化で約 32 kJ/mol である (pH に依存する)。右辺の値は通常の pH や実験条件下で 200–600 mV に相当する。たとえば $\Delta\phi=0$, $\Delta pH=2-3$ なら $1/F \cdot \Delta\bar{\mu}_{H^+}$ は 180 mV となり $n=2$ か 3 で (4) 式が成立する。最適実験条件下では 2 H^+ で ATP が合成される。

化学浸透圧説は電子伝達系と葉緑体やミトコンドリアの ATP 合成のエネルギー共役機構を示しただけでなく、細胞膜を始め様々な生体膜系でのイオンや分子の輸送現象についての理解を進めた。最近では、分子構造の解明や 1 分子観察法により、ATP 合成酵素の膜外側部位 (F_1 部位) の回転にともなう ATP 合成が示されている。たった 2 名の Glynn Research Laboratory (ロンドン大学に今でも記念研究室がある) の小さな研究室で P. Mitchell が主張し、戦った新しい考え方が生命理解の基本概念の一つとなった。

(3) 電子伝達系による $\Delta\phi$ と $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の形成

葉緑体チラコイド膜では、図 1 に示すように膜の内側から外側に電子が動き、膜内側が正の電位差 (膜電位 $\Delta\phi$) が生じる。内側正の $\Delta\phi$ に逆らってより $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を高める方向に H^+ が運ばれる。膜を横切る電子やイオンの移動は $\Delta\phi$ を変える。一方、膜表面での H^+ の放出や吸着などは $\Delta\phi$ を変えず、 ΔpH のみに影響する。 ΔpH と $\Delta\phi$ に応じて $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ が変わる。膜横方向での電子や H^+ の移動は同じ溶液相内での別のイオンの動きでうち消されるので $\Delta\phi$, ΔpH を変えない。膜で隔てられた溶液相間では、膜を横切る電子やイオンの動き (電流) が無い限り $\Delta\phi$ は変化しない。

7.1.2 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の解消と脱共役

(1) 様々な $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の解消過程

$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ は ATP 合成や (図 1) やイオン透過性を変える試薬の添加で変化する (図 2)。それぞれの過程を以下に説明する。

- 1) ATP 合成: $\Delta\phi$ や ΔpH は、膜を通してイオンや H^+ が動けば変わる。光で駆動される電子伝達反応と逆向きに ATP 合成で H^+ が動けば、エネルギーが得られ、その分 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ は減少する (図 1)。
- 2) 表面活性剤: 膜に孔をあけたり、壊したりして H^+ や他のイオンが自由に動けるようにすると、ATP を

合成しなくても $\Delta\phi$ は減少する。たとえば、表面活性剤トリトン X-100 を膜構造を大きくこわさないような低濃度 (0.01%) 加えるだけでも、膜のイオン透過性は高まり、 $\Delta\phi$ と ΔpH は消失する。ATP 合成も阻害される。

- 3) イオノホア: イオンの膜透過性を選択的に変える様々な分子が知られている (図 2)。これらの組み合わせで、ATP 合成と $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の関係が確認された。

細菌を殺す抗生物質として発見されたバリノマイシンは K^+ と膜透過性の高い包摂化合物をつくる。 K^+ バリノマイシンの高い膜透過性により K^+ の動きが促進され、(K^+ 濃度差が大きくなければ) $\Delta\phi$ のみが消失する。従って、バリノマイシン添加のみでは ATP 合成は阻害されない。逆に膜内外液相間に K^+ 濃度差を作っておき、バリノマイシンを加えると濃度差に応じた $\Delta\phi$ (拡散電位: 式 3 で $\Delta\bar{\mu}_x=0$ に相当) が一時的に形成される。 K^+ 移動により濃度差が解消するとともにこの $\Delta\phi$ は消える。

グラミシジンは膜に穴を開け、 H^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ などの透過性を増大し、 $\Delta\phi$ を消失させる。この場合には ΔpH も消失するので ATP 合成が阻害される。

ナイジェリシンは H^+ との結合型と K^+ との結合型が共に電荷なしに膜を透過するので H^+ と K^+ の交換を早める。この交換は $\Delta\phi$ の変化をもたらさない。従って K^+ 存在下で $\Delta\phi$ は消さずに ΔpH だけを消す。ATP 合成は阻害しない。

農薬でもある CCCP (carbonylcyanide *m*-chloromethoxyphenylhydrazone) は H^+ 結合型 (中性)、非結合型 (負イオン) とともに高い膜透過性をもち H^+ 透過性を高める。負イオン型の動きは $\Delta\phi$ を H^+ 結合型の動きは ΔpH を消し、 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ を消失させる。従って ATP 合成を強く阻害する。

- 4) 膜透過性のアミン類: 中性では膜透過性が高く、 H^+ を結合し荷電型になると膜を透過できないようなアミン類 (アンモニアやアルキルアミン) は、 ΔpH が形成され膜内側の H^+ 濃度が高くなると膜内側溶液中に蓄積し、結果として ΔpH だけを消す。低濃度のアミンは ATP 合成をとめないが、高濃度加えると ΔpH の寄与が大きい葉緑体などでは ATP 合成をかなり抑制する。また、 ΔpH にあまり影響しない低濃度 (数 μM 程度) で分布を測定できる蛍光性や放射性アミンの膜内外での分布差から、 ΔpH を測定できる (9-アミノアクリジンや、同位体置換したメチルアミンなど: 表 1)。

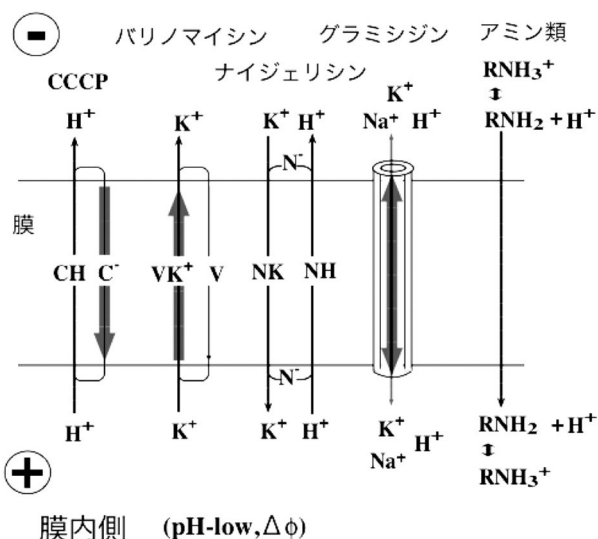


図2：イオノホアとアミン類による膜透過性と、 ΔpH 、 $\Delta\phi$ の変化の模式図

(2) 脱共役と電子伝達速度

1) 脱共役：電子伝達反応は $\Delta\phi$ や ΔpH を作り出す。では $\Delta\phi$ や ΔpH が変わると、電子伝達速度はどうなるだろうか？

$\Delta\phi$ に応じて、膜内成分の酸化還元電位は実質的に変化する。たとえば、酸化還元滴定では、外部溶液に加えたメデエーターの酸化還元状態を溶液中の電極等により電位としてモニターし、それと平衡な膜内電子伝達成分の酸化還元状態をみる。しかし電極面と違う電位 $\Delta\phi$ がある膜内側の成分に電子を渡すためには、 $-\Delta\phi$ の寄与分だけ余分に仕事が必要なので、見かけの酸化還元電位の値も $\Delta\phi$ だけずれる。これは、膜内側に正の $\Delta\phi$ がかかっているならば、負電荷をもつ電子はより多く存在できる（平衡下では、式3で $\Delta\bar{\mu}_e = 0$ であるから、 $\Delta\phi$ 分だけ $\log(e^-)$ が変わるはずである）として定性的にも理解できる。ある成分についての電子の濃度（＝酸化還元状態）が変われば反応速度も変わる。従って、 $\Delta\phi$ に応じて、電子伝達速度は変化する。また膜内 pH の変化も H^+ 濃度を変えて反応速度を制御する。定常光照射下でできる $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ が光反応で生み

出される自由エネルギー変化と釣り合えば、そこで電子伝達速度も遅くなり、後は $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ の減少分だけしか電子伝達が進まなくなる。ここで ATP 合成を促進して $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ を減少させれば電子伝達速度は再び早まる。同様に、イオノホアや表面活性剤添加などで $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ を下げると電子伝達は速くなり、ATP 合成もとまる。これを脱共役とよぶ。

2) 膜表面電位：膜表面はタンパク質などの固定電荷により、溶液中に比べて通常 10-50 mV 負に帯電している。すなわち、式3を同じ溶液中とそれとつながる膜表面に当てはめると $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} = \text{ゼロ}$ でも、表面での局所的な固定電荷の密度は違うので、電位、イオン濃度、 H^+ 濃度は異なり、反応速度に影響を与える。この固定電荷による外液相と膜表面との電位差を「膜表面電位： $\Delta\psi$ 」とよぶ。固定電荷の影響は他のイオンがあれば遮蔽されるので、溶液の塩濃度の $-1/2$ 乗に依存して変化する。低塩濃度では大きく（チラコイド膜では 10 mM NaCl 存在下で $\Delta\psi = -60$ mV 程度）、高塩濃度ではより小さくなる。膜表面電位は膜電位と違い膜を隔てての（溶液相間の） $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ に影響せず、エネルギー共役で直接影響を与えない。しかし、膜表面での電子伝達速度には大きく影響する⁶⁾。例えば、式(3)から、

$$\Delta\bar{\mu}_{\text{表面-外液中}} = 0 = 2.3RT \cdot \log(C_{\text{表面}}/C_{\text{外液中}}) + z_1 F \Delta\psi_{\text{表面-外液中}} \quad (5)$$

となり、-3 価のフェリシアナイドを pH 7 の反応液に 1 mM 加えると、10 mM NaCl 存在下で $\Delta\psi = -60$ mV の膜表面では、

$$C_{\text{表面}}/C_{\text{外液中}} = 10^{(-z_1 F \Delta\psi / 2.3RT)} = 10^{-3}$$

となり、表面濃度は加えた濃度の 1/1000、すなわち 1 μM と計算される。NaCl 濃度を 100 mM に上げるか、1 mM の MgCl_2 の添加により全体で負に荷電した膜表面の固定電荷の影響を遮蔽してやると、 $\Delta\psi = -20$ mV に下がる。すると $C_{\text{表面}}$ は 10 倍あがる。当然、膜表面での反応速度も促進される。一方、電荷を持たない中性試薬の表面濃度は変わらず、正電荷を持つメ

表1：定常光下での、紅色細菌クロマトホア膜小胞での $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ 測定例、 $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ は mV 単位で表示、括弧内は測定方法

試料	ΔpH	$\Delta\phi$ (mV)	$\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ (mV)	文献
<i>Rb. sphaeroides</i> クロマトホア	-3 ~ -3.3 (9-アミノアクリジン蛍光法)	200-240 mV (カロテノイド吸収帯シフト)	350-440 mV	7
<i>Rs. rubrum</i> クロマトホア	-1.8 (C^{14} -メチルアミン分布)	89 mV (C^{14} -SCN ⁻ 分布)	200 mV	8

チルピオローゲンなどの膜表面濃度は外液中より高くなっている。従って、生体膜上にある分子の見かけの酸化還元電位や、外部から加えたイオン性の分子との反応速度は膜表面電位に大きく影響される。酸化還元電位の決定や反応速度を測定するときには、塩濃度や pH の効果を確かめておくことが必要である。

7.1.3 膜電位の実測：カロテノイドシフトとイオンの分配

大きさが数十ミクロンある動植物細胞などでは膜内外溶液相に電極をいれ、膜電位を直接電位差として測定できる。しかし、チラコイド膜小胞や、光合成細菌の内膜（クロマトホア膜）などは数ミクロン以下であり、電極をいれるには小さすぎる。このため膜内部に結合しているカロテノイド色素や外部から入れた電位感受性試薬などの吸収変化や蛍光などを分光的に測定する。 $\Delta\phi$ に応答する事が知られている、チラコイド膜内タンパク質に結合したカロテノイド色素の吸収帯のシフトを利用した測定法を図 3 にしめす。タンパク質の膜内特定位置に結合したカロテノイドは極性の違いで有機溶媒溶液中と異なるスペクトルを示すだけでなく、各々の周囲アミノ酸残基が作る局所的な外部電場強度の 2 乗に応じて吸収波長を変えている。さらに膜電位変化に伴う小さな電場変化 $\Delta\phi$ がこれに加わると、ほぼ $\Delta\phi$ に比例した吸収変化量を示す。同様な現象は紅色細菌膜のアンテナ色素タンパク質 LH₂ に結合したカロテノイドでも知られている。表 1 にはこれと、イオン分布測定法による $\Delta\phi$ 測定結果を示す。

(1) 膜結合カロテノイドの吸光度変化（カロテノイドシフト）による $\Delta\phi$ 測定^{4),5)}

試料：反応液：3 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 8.0, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂ にホウレンソウクラス II 葉緑

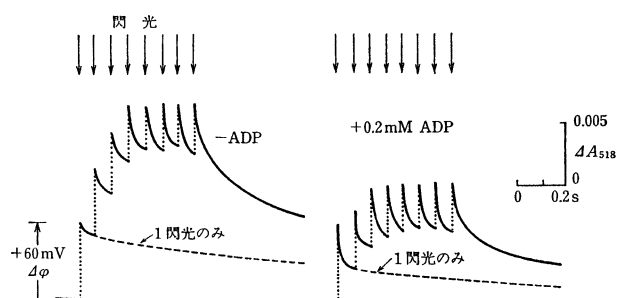


図 3：518 nm でのカロテノイド吸収変化を利用した膜電位の測定。飽和光強度の 10 μ s の閃光を逐次 8 発当てた際の変化。下向き矢印は閃光照射の時間を示す。左右図はそれぞれ ATP の合成が抑制されている時と促進されている時を示す。1 閃光で約 60 mV の膜の内側が正の $\Delta\phi$ が形成される。

体 (30 μ g chl/ml) を懸濁する。新鮮なホウレンソウ葉を用い、1–2 分くらいで手早く葉緑体を低温で単離し⁵⁾、測定する。時間とともに、膜系のイオン透過性が上がるので試料を調整し直す。発光時間 10 μ s の Xe 放電管 (Sugawara MF-1500-U3) 付きの閃光分光装置で 518 nm でのカロテノイド吸光度変化を測定した。試料は 1 x 1 x 5 cm の 4 面透明ガラスセルに 2 ml 入れた。閃光分光装置は散乱が多くても測定できるように、検出器と試料間が近いタイプがよい (2e 参照)。励起閃光は色ガラスフィルター (650 nm 以上の光を通すカットオフフィルターを 2 枚) を通して試料にあて、強度を変えて吸収変化量がほぼ飽和していることを確かめておく。試料と検出器間には、閃光の漏出を防ぐため、518 nm に透過ピークをもつ干渉フィルターか青色ガラスフィルター (Corning 4-96) をいれ、信号/ノイズ比を高めるために、信号を加算平均した。

解説：閃光照射により、電子が光化学系 I, II 反応中心内で膜内から外側にながれ、 $\Delta\phi$ が生じる。この $\Delta\phi$ 値は、膜という平板コンデンサーに電荷を与えた際の電圧変化と同様に考えることが出来、電荷密度（光に応答する反応中心量）と電気容量（膜の厚さと膜の誘電率に依存）がわかれば電圧変化が計算できる。I, II 反応中心の膜上での存在密度と膜の電気容量（約 1 μ F）から、約 60 mV の膜内側正の $\Delta\phi$ が 1 閃光照射後数ナノ秒で作られると計算できる⁴⁾。図 1 はキセノン放電管の閃光を繰り返し 8 発与えたときの吸光度変化をしめす。1 閃光あたり 60 mV とすると、定常レベルではこの 3 倍の 200 mV 程度の $\Delta\phi$ が生じる。ADP を加えて ATP 合成を促進すると新たな速い $\Delta\phi$ の減衰（半減期 15 ミリ秒）が見られた。 $\Delta\phi$ が ATP 合成で消費されることがわかる。

チラコイド膜では $\Delta\phi$ 消失速度は比較的速く定常光照射下での $\Delta\phi$ はあまり大きくならない一方、水の分解反応などで Δ pH=3 以上（室温で 180–240 mV の $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ に相当する）が形成される。光照射下の定常状態での $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ は 300–400 mV と推定される。 $\Delta\phi$ の測定にはこの他に、電位感受性色素（メロシアンニンなど）の吸収変化もよく使われる⁶⁾。

(2) 紅色光合成細菌の単離クロマトホア膜での、 $\Delta\phi$, $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ の測定例

カロテノイド吸収変化を示す紅色光合成細菌での実測例を示す (表 1)。細胞膜とつながる光合成細菌のクロマトホア膜小胞系では Δ pH が小さく、 $\Delta\phi$ のほうが $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ への寄与が大きい。

イオン透過性の低いクロマトホア膜では、外部溶液内の K^+ 濃度を変え内外溶液相間にあらかじめ K^+ 濃度差をつくり、バリノマイシンを添加すると一時的に拡散電位による $\Delta\phi$ を数分間安定に形成できる。この時の吸収変化量と比較することでカロテノイド吸収変化量と $\Delta\phi$ 間の関係を得て、光照射時の $\Delta\phi$ を算定する⁷⁾。しかし、カロテノイドシフトを示さない紅色光合成細菌種も多い(例えば *Chromatium vinosum*, *Thermochromatium tepidum* など)。膜透過性のイオン(たとえば表1中の C^{14} -SCN⁻)の膜内外での分配から $\Delta\phi$ を算定することも行われている。

表1上段の実験では ΔpH は9-アミノアクリジンの蛍光強度の減少として測定している⁷⁾。このアミン色素は膜小胞内部に入ると H^+ を結合し正に荷電して、膜透過できず内部にたまる。内部の高濃度状態では蛍光強度が弱まる。この変化量から ΔpH に換算するには、同じような条件下で内外 pH を人為的に変えて作った状態での ΔpH に対する応答と比較するか膜小胞内部体積をみつもって計算する⁷⁾。表1下段には放射性のアミン分子の分配から計算した ΔpH を示す⁸⁾。使用する膜透過性イオ

ン濃度が高いと ΔpH や $\Delta\phi$ そのものが減るので、濃度を変えて測定するなどの注意が必要である。

引用文献

- 1) P. Mitchell (1966) Chemiosmotic coupling on oxidative and photosynthetic phosphorylation, Glynn Research, Bodmin.
- 2) P. Mitchell (1966) Chemiosmotic coupling and energy transduction, Glynn Research, Bodmin.
- 3) 伊藤繁 光合成細菌(北村博, 森田茂広, 山下仁平編) 膜電位, P.251 学会出版センター (1984)
- 4) W. Junge and H. T. Witt (1968) Z. Naturforsch. **23b** P. 244.
- 5) S. Itoh and S. Morita (1982) Biochim. Biophys. Acta **682** P.413.
- 6) K. Masamoto, K. Matsuura, S. Itoh and M. Nishimura (1981) Biochim. Biophys. Acta **638** P.108.
- 7) A. Baccarini-Melandri, R. Casadio, B. A. Melandri (1977) Eur. J. Biochem. **78**, P.389.
- 8) S. Schuldiner, E. Padan, H. Rottenberg, Z. Gromet-Elhanan, M. Avron (1974) FEBS Lett. **49**, P.174.