

生体エネルギー産生膜の膜電位形成におよぼす  
海洋環境汚染化合物（トリアルキルスズ化合物）の影響  
- 生体膜電位測定のためのTPP<sup>+</sup>電極の応用 -

沖増英治・西尾克己\*・芦田貴行・雨村明倫

福山大学内海生物資源研究所

Effect of a Marine Pollutant ( TBTO ) on Changes in the Membrane Potential of Mitochondria.

Eiji Okimasu, Katsumi Nishio, Takayuki Ashida and Akinori Amemura  
( Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho,  
Innoshima, Hiroshima 722-21, Japan )

*Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.6, 29 - 38 (1995).*

The effect of bis[tris-*n*-butyltin(IV)]oxide, TBTO, on the energy-linked membrane potential of rat liver mitochondria were studied. The assay of membrane potential was examined by tetraphenyl phosphonium ion (TPP<sup>+</sup>) - selective electrode.

An addition of TBTO induced varying degrees of release of incorporated TPP<sup>+</sup> into the incubation medium (dissipation of membrane potential), and above 0.1 ppm, the release of TPP<sup>+</sup> increased progressively with increasing concentrations. TBTO caused an instantaneous release similar to 2,4-dinitrophenol (DNP). Adenosine diphosphate (ADP) elicited a rapid efflux of accumulated TPP<sup>+</sup> (indicative of depolarization) followed by its reaccumulation (indicative of repolarization). The inhibitory effects of TBTO on this depolarization with a subsequent repolarization in the presence of  $\alpha$ -ketoglutarate (NADH-dependent substrate) were more effective than those of the changes of membrane potential in the presence of succinate (FADH<sub>2</sub>-dependent substrate). The obtained results show a rotenone-like inhibition of electron transport pathway on NADH-dependent substrate.

---

\* 現住所： 日本メンテナンスエンジニアリング(株) 〒530 大阪市北区同心1丁目7-14

有機スズ化合物の使用は、現在、厳しく規制されているが、これまで農薬として、また海洋性付着生物の忌避剤として広く一般に利用されてきた<sup>1,2)</sup>。トリブチルスズは、船底塗料として一般的な有機スズ化合物である。この化合物は、海水に溶け込み港湾を汚染し、水棲生物体内に蓄積濃縮されている<sup>3)</sup>。さらにトリブチルスズは、哺乳動物種に対して生体毒性を示し、比較的低濃度でラットのリンパ球数の減少や胸腺の退縮など免疫担当細胞に特異的に作用している<sup>4,5)</sup>。この選択的細胞毒性の機構は依然として議論されており、生体高分子の生合成やミトコンドリアのエネルギー代謝阻害<sup>6)</sup>や DNA 生合成の障害<sup>7)</sup>、さらには、細胞膜との直接作用<sup>8)</sup>などによると考えられている。さきに、我々は、ラット肝細胞内のエネルギー産生機構に及ぼすこれらトリブチルスズの影響について検索し、これら化合物が極く低濃度でミトコンドリア内膜の電子伝達系蛋白の機能に影響していることを報告した<sup>9)</sup>。

そこで、近年、様々な分野で応用されている脂溶性イオンを利用した生体膜電位測定のうちでも、生体膜とほとんど結合しない tetraphenyl phosphonium ion (TPP<sup>+</sup>) によるイオン電極を用いて、ミトコンドリアのエネルギー産生機構におよぼすトリブチルスズの影響について検索した。

## 材料および方法

生体膜試料とし Wistar 系ラット肝のミトコンドリアを、以下に述べる Hogeboom-Schneider 変法<sup>10)</sup>により分離・分画し実験に供した。生体代謝活性を抑制するために、実験前日より絶食していたラット(体重 250 g 前後)からの肝臓を放血後、A 液(0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4)で洗浄し、2~3 mm 立方塊になるまでメスバサミで細切する。その後、ガラスホモゲナイザー、続いてテフロンホモゲナイザーを用いて肝組織を粉碎する。この操作で得られたオルガネラ画分と未破碎組織とを遠心分画するために、分離用冷却遠心機(TOMY製 CX-25, Rotor No.4N)を用いて 4℃, 800 rpm, 5分間の遠心分離を行う。得られた上清画分を、あらかじめ遠心チューブ内にその 1/3 容量入れてある B 液(0.33 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4)の上層に注意深く重層し、800 rpm, 5分間、続いて 2,500 rpm, 10分間の遠心操作を行う。得られた上清の 8,000 rpm, 10分間の遠心によりミトコンドリア画分を回収し、C 液(0.25 M sucrose, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4)を用いて、9,000 rpm, 10分間の遠心操作によりミトコンドリアを洗浄し、試料とした。その蛋白量は Biuret法<sup>11)</sup>によって求めた。

膜電位測定のための TPP<sup>+</sup> 電極の作製法は既報<sup>12)</sup>に従った。即ち、10% polyvinyl chloride (PVC) を tetrahydrofuran (THF) に溶解し、その 5 ml を THF に溶解した 10 mM tetraphenylborate-Na (TPB) 3 ml と混合し、それに可塑剤として 1.5 ml の dioctylphthalate を加え、φ 8.5 cm のガラスシャーレに広げ、一夜放置し、PVC の薄膜を作る。この膜を φ 0.8 x 10 cm の塩ビ管の一端に THF によって接着させる。この管内に 10 mM の TPP<sup>+</sup> を入れ銀

一塩化銀を挿入して  $\text{TPP}^+$  電極とし、対照電極にはカロメル電極を用い、pHメーター（日立堀場製 F-7 型）に接続して、その出力を直流増幅し、変化する値をペンレコーダーで測定記録した（Fig.1）。

$\text{K}^+$  イオン測定は恒温装置付きイオンメーター（ORION 製 92A pH / ISE Meter）とパーソナルコンピューター（PC9801-RX）を用いて測定した。

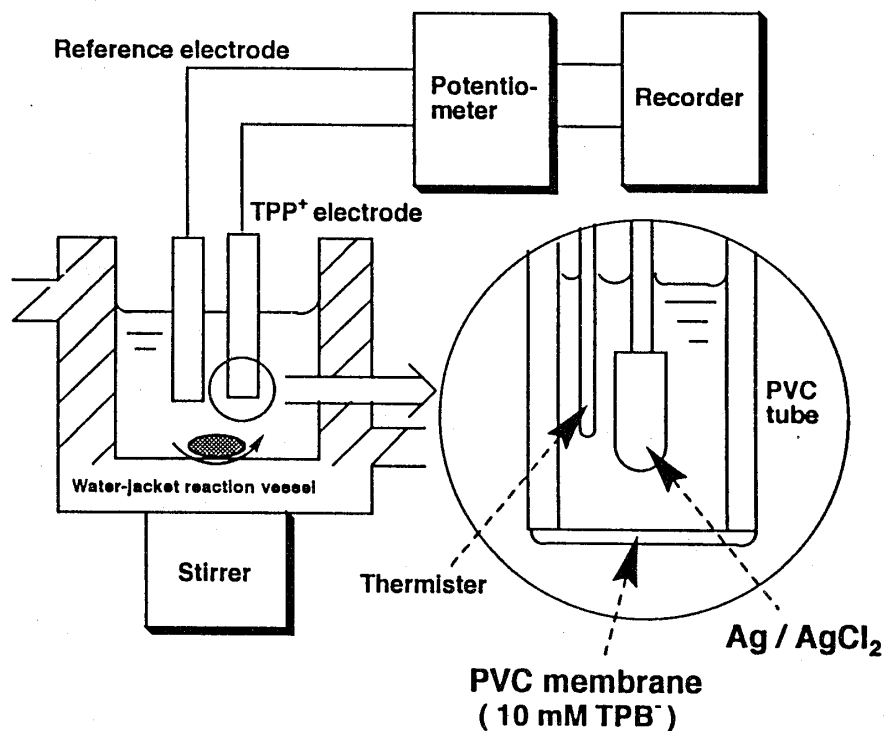
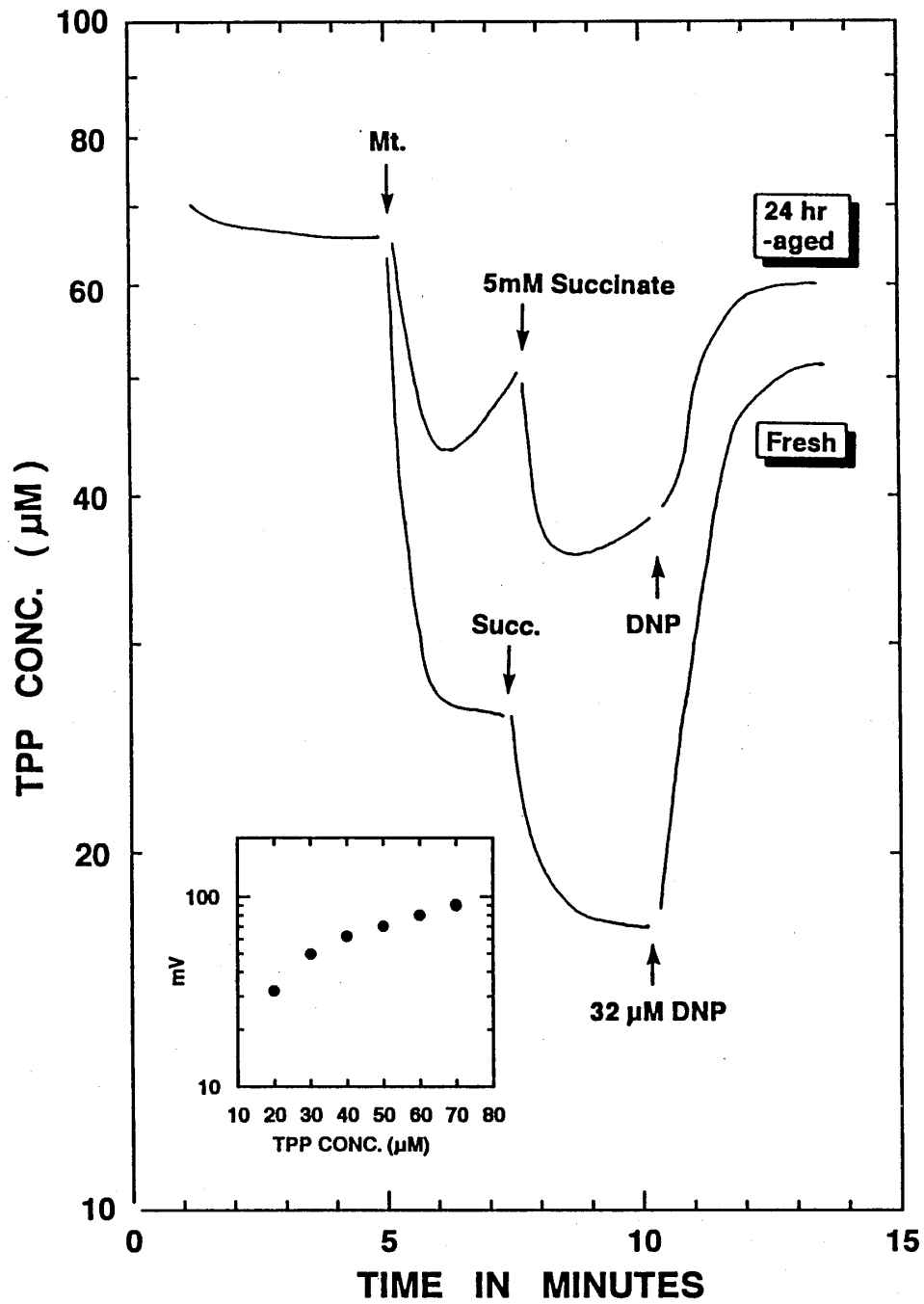


Fig. 1 Illustration of tetraphenyl phosphonium ( $\text{TPP}^+$ )-selective electrode.

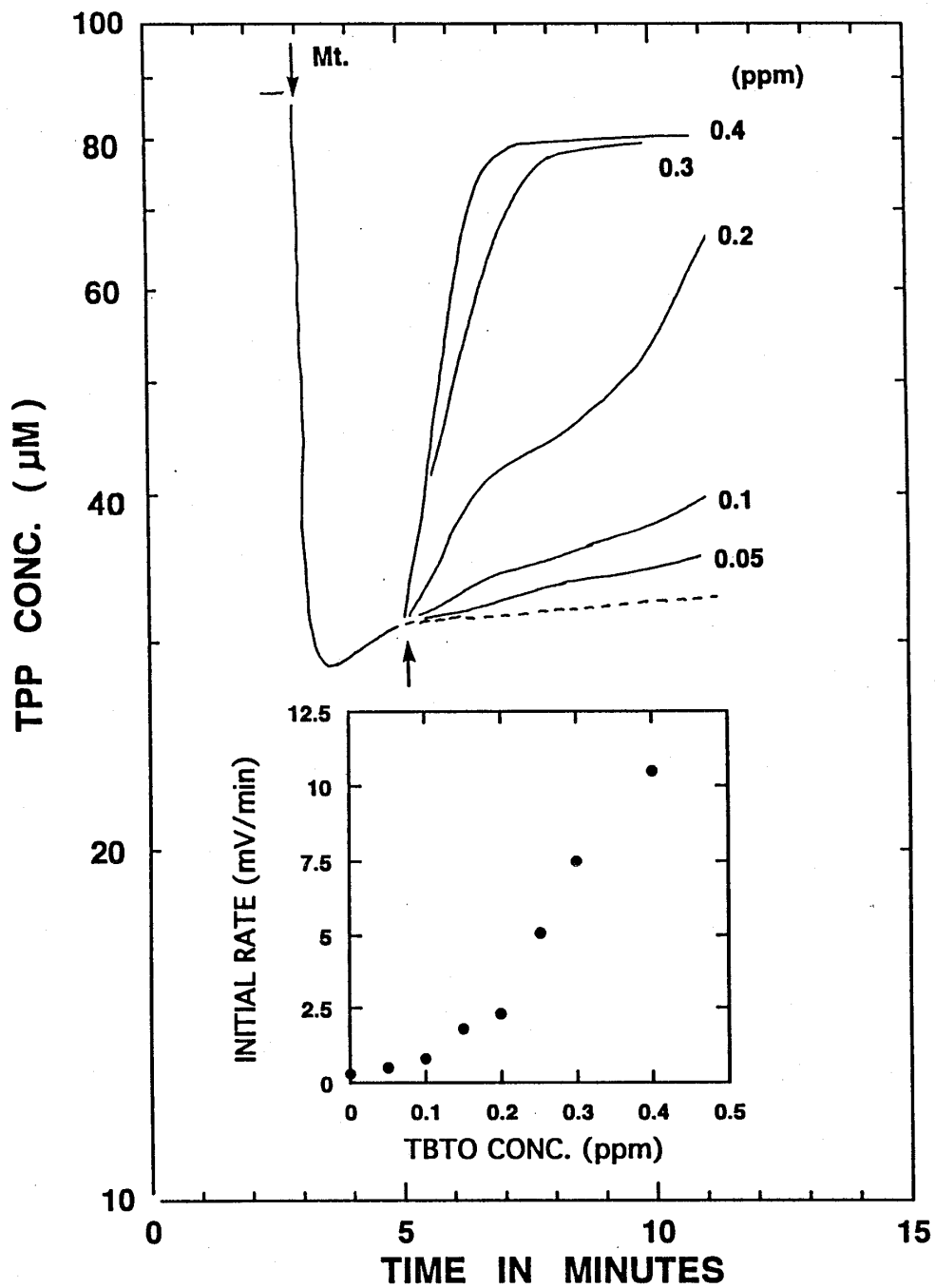
### 結果および考察

ミトコンドリア (Mt.) のエネルギー状態の違いによる膜電位変化

作製した  $\text{TPP}^+$  電極を用いて、Mt. のエネルギー状態を測定できるか否かについて確かめるた



**Fig.2. Changes in the membrane potential of fresh or 24 hr-aged rat liver mitochondria after preparation.**



**Fig.3. Effect of TBTO on the movement of  $\text{TPP}^+$  across the mitochondrial membrane.**

Rat liver mitochondria ( 1 mg / ml ) were incubated with various concentrations of TBTO in respiration buffer ( 150 mM sucrose, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4 ) containing 5 mM succinate and 50  $\mu\text{M}$  TPP at 25°C.

めに、ラット肝より分離した新鮮な Mt. 試料と、分離後 24 時間冷蔵保存した Mt. 試料を用いて、Mt. の電子伝達反応に伴う膜電位を測定した( Fig.2 )。作製した TPP<sup>+</sup> 電極は Fig.2 に挿入した図に認められるように、添加 TPP<sup>+</sup> 濃度と測定した電極電位との間に一定の関係が得られた。

Fig.2 に示されるごとく、新鮮な Mt. は大きな膜電位を形成し、その静止膜電位は安定するが、分離後時間経過した古い Mt. ではその膜電位は安定せず、徐々に電位を失ってしまう。また、その後の呼吸基質や脱共役剤添加に伴う膜電位変化も正しく測定されない。また、加茂ら<sup>12)</sup>によれば、TPP<sup>+</sup> による膜電位測定は TPP<sup>+</sup> が生体膜にほとんど結合しない事より、

$$\text{式 } \Delta \psi = 2.3RT/F \cdot \log v/V - 2.3RT/F \cdot \log [10^{(F\Delta E/2.3RT)} - 1]$$

|   |   |         |            |   |        |
|---|---|---------|------------|---|--------|
| F | ; | ファラデー定数 | R          | ; | 気体定数   |
| T | ; | 絶対温度    | V          | ; | 反応液の容積 |
| v | ; | Mt.容積   | $\Delta E$ | ; | 電極電位   |

により、膜内に取り込まれた量から膜電位を求めることができる。

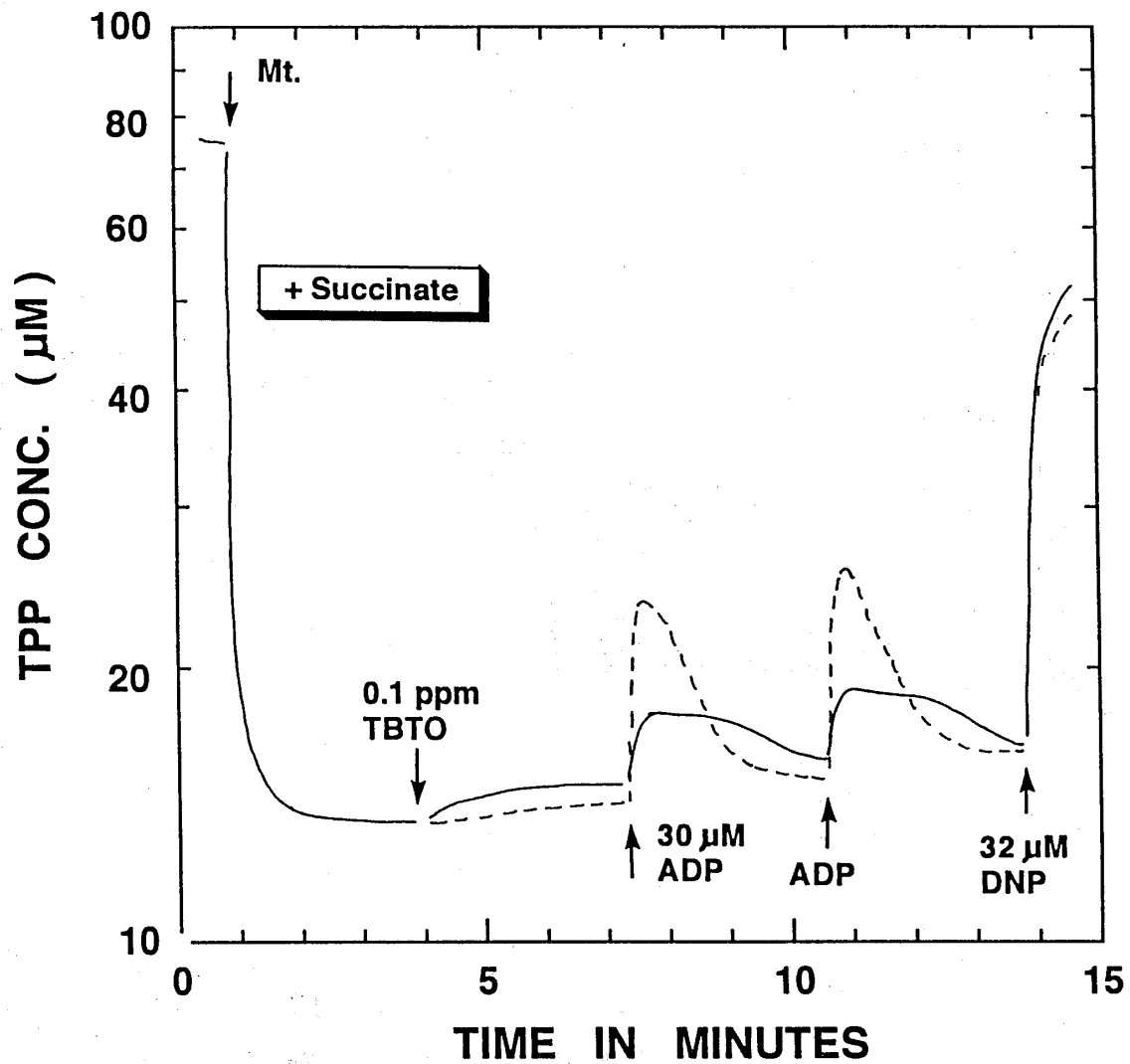
#### Mt. の静止膜電位に及ぼす TBTO の影響

呼吸基質のコハク酸添加によって形成された静止膜電位に及ぼす TBTO の影響を確かめた結果( Fig.3 ), TBTO の添加濃度に応じて、その膜電位は失われ、脱分極現象が促進されることが認められた。その脱分極現象は、イオンメーターを用いた K<sup>+</sup> 遊出によっても証明された(結果は示さず)。また、既報<sup>9)</sup>のごとく酸素消費能から測定した Mt. の酸化的リン酸化反応に及ぼす TBTO の影響が、本研究においても 0.1 ppm 付近より認められた。また、その有効濃度はその初速度の変化( Fig.3 の挿入図参照 )より、正確な濃度変化を示すことができた。

#### Mt. の ATP 合成に伴う膜電位変化に及ぼす TBTO の影響

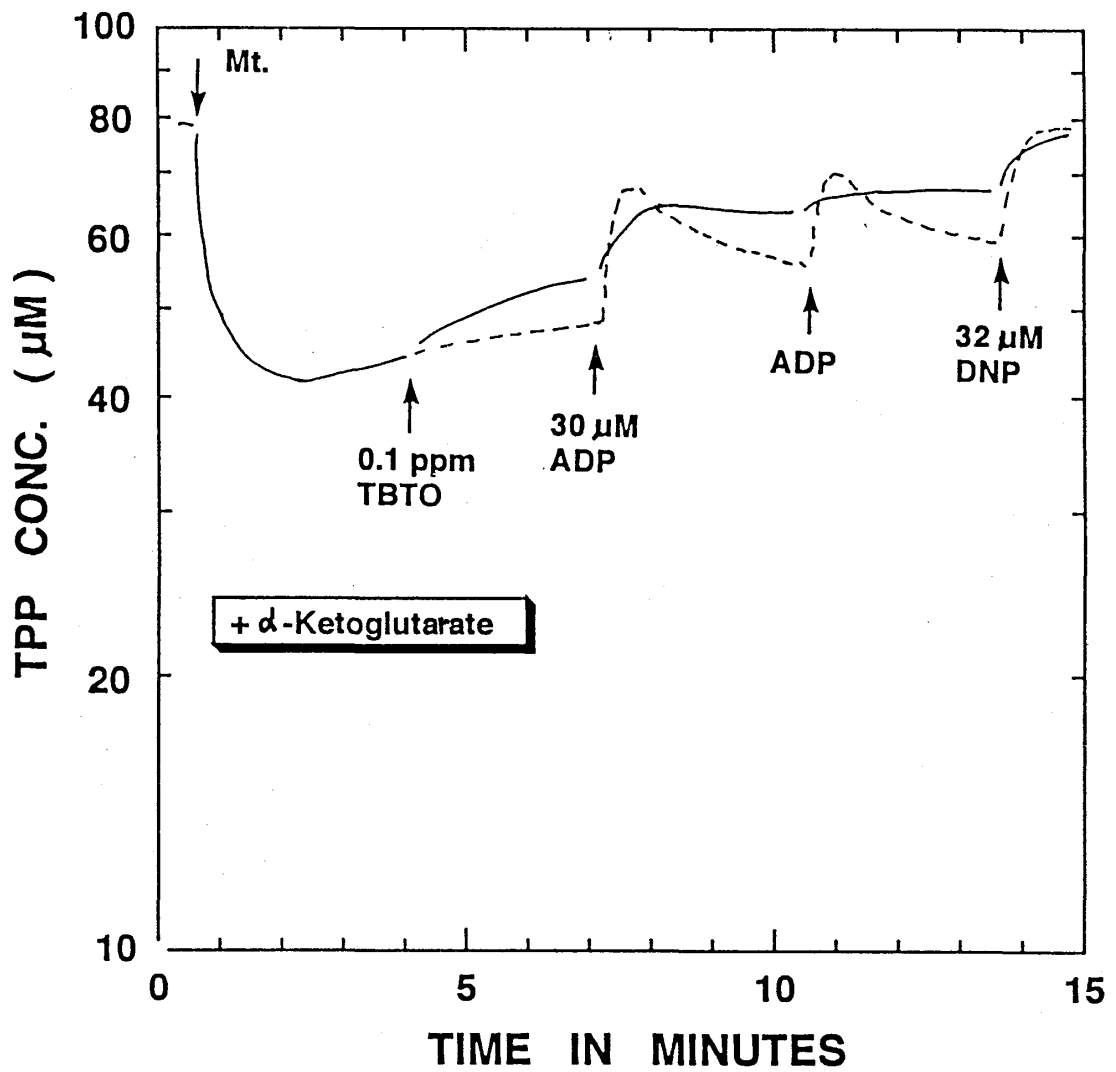
Mt. 膜内での ATP 合成は、発熱反応と吸熱反応に分けられるが、電子伝達に共役して起こる酸化的リン酸化は基質による酸化還元反応の際に遊離されるエネルギーによって、ADP がリン酸化されて ATP を合成する<sup>10)</sup>。電子が NADH や FADH<sub>2</sub> から O<sub>2</sub> に流れるときに Mt. の膜内外に H<sup>+</sup> の濃度勾配が形成され、また、膜内外のイオン輸送が行われるため、膜電位が形成される。そこで、酸化的リン酸化反応によって ATP が合成される時の膜電位変化が TBTO 添加によりどのような影響を及ぼすかについて検索した。

Fig.4 より各々の基質添加後の静止膜電位の状態を測定した結果、NADH 依存性の  $\alpha$ -ケトグルタル酸(  $\alpha$ -KG )よりコハク酸の場合の方が、その膜電位が高く、ラット肝 Mt. の基質利用の優位



**Fig.4. Effect of TBTO on changes in the membrane potential of rat liver mitochondria in the presence of succinate as substrate.**

Experimental conditions are described in Fig.3.



**Fig. 5. Effect of TBTO on changes in the membrane potential of rat liver mitochondria in the presence of  $\alpha$ -ketoglutarate as substrate.**

Experimental conditions are described in Fig. 3.



性が示された。その後、破線で示したごとく、限られた ADP 添加にともない速やかな脱分極現象が生じ、続いて添加した ADP のリン酸化反応が弱まり ATP 合成の減少とともに、元の静止膜電位に戻る過分極方向への現象が認められた。この膜電位分極変換現象に及ぼす TBTO の効果は、濃度依存的に認められた（結果は示さず）。しかし、2,4-ジニトロフェノール( DNP )添加にともなう膜電位消失の脱共役反応にはほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、TBTO は電子伝達反応のコハク酸以降の電子の流れを阻害しておらず、ATP 合成酵素 ( ATPase ) を阻害するオリゴマイシン様の阻害作用を示すことが示唆された。

$\alpha$ -KG 基質依存性の酸化的リン酸化反応に認められる脱分極に続く過分極現象は、TBTO 添加により過分極方向への電位変化がほとんど阻害されることより ( Fig.5 ), 既に報告した事実と同様な結果が得られた。すなわち、TBTO は電子伝達反応阻害剤であるロテノン様作用であり、電子伝達の部位 I に影響を及ぼしていることが推察された。

## 要 約

ラット肝ミトコンドリアのエネルギー依存性膜電位変化に応じて、反応液内のイオン濃度が変化する脂溶性イオン ( tetraphenyl phosphonium ion, TPP<sup>+</sup> ) の濃度を選択的に測定できる TPP<sup>+</sup> 電極を作製し、海洋環境汚染化合物のもたらす影響について検討した。

1. 作製した TPP<sup>+</sup> 電極を用いてミトコンドリアのエネルギー状態の変化をその膜電位変化として捉えることができた。
2. TBTO 添加は、形成される膜電位を消失させる効果として認められた。
3. コハク酸基質依存性の ADP リン酸化反応で生じる膜電位変化は、 $\alpha$ -ケトグルタル酸基質依存性の膜電位変化と比較して、ADP 添加後、大きな脱分極に続く過分極方向への膜電位変化が認められたが、TBTO の阻害効果は、後者の場合に強く認められた。
4. DNP 添加によるプロトン依存性脱共役の膜電位変化には、TBTO は、ほとんど影響を与えなかった。

以上の結果より、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系部位 I への阻害が推察された。また、TPP<sup>+</sup>電極が、海洋汚染化合物の生物毒性モニタリング機器の一つとして有効であることが示唆された。

## 文 献

- 1) I. J. Bayer : *Toxicology*, **55**, 253 - 298 (1989).
- 2) R. V. Subramanian : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **446**, 134 - 148 (1985).

- 3) I. Bjorklund : *KEMI Report*, 8, 1 - 50 (1989).
- 4) N. J. Snoeij, A. A. J. Van Iersel, A. H. Penninks and W. Seinen : *Food Chem. Toxicol.*, 24, 599 - 600 (1986).
- 5) R. J. Smialowicz, M. Riddle, R. R. Rogers, R. W. Luebke and C. B. Copeland : *Toxicology*, 57, 97 - 111 (1989).
- 6) N. J. Snoeij, P. M. Punt, A. H. Penninks and W. Seinen : *Biochim. Biophys. Acta*, 852, 234 - 243 (1986).
- 7) W. Seinen and A. H. Penninks : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 320, 499 - 517 (1979).
- 8) B. H. Gray, M. Porvanzink, C. Flemming and H. L. Lee : *Toxicology*, 47, 35 - 54 (1987).
- 9) E. Okimasu, S. Mamiya, Y. Yoshida and A. Amemura : *Report Res. Inst. Marine Biores., Fukuyama Univ.*, 3, 19 - 30 (1992).
- 10) M. Miyahara, K. Utsumi and D. W. Deamer : *Biochim. Biophys. Acta*, 641, 222 - 231 (1981).
- 11) A. G. Gornall, C. J. Bardawill and M. M. David : *J. Biol. Chem.*, 177, 751 - 766 (1949).
- 12) N. Kamo, M. Muratsugu, R. Hongoh and Y. Kobatake : *J. Membr. Biol.*, 49, 105 - 112 (1979).