

ミトコンドリア膜の示差走査熱量測定

足立香代*, 桃田道彦**, 若林 隆*

(昭和61年12月3日受理, 昭和62年1月13日再受理)

Differential Scanning Calorimetry of Mitochondrial Membranes

Kayo Adachi*, Michihiko Momota** and Takashi Wakabayashi*

Physicochemical properties of rat liver mitochondrial membranes have been studied using differential scanning calorimetry (DSC). Exothermic and endothermic lipid phase transition temperatures of mitochondria were detected at -10.5°C and -4.6°C , respectively. Lipid phase transition temperatures of the outer and inner membrane fractions were almost the same although their membrane compositions were different from each other. Mitochondrial lipids free from cholesterol have revealed two distinct, broadened peaks suggesting that cholesterol plays a key role in the cooperativity of membrane lipids protecting them from phase separations.

There were practically no differences in lipid phase transition temperatures between intact mitochondria and their extracted lipid fraction. However, fluorimetric analysis of the latter revealed an increase in the membrane fluidity. Effects of Ca^{2+} , freezing-thawing and ethylene glycol on the physicochemical properties of mitochondrial membranes were also investigated.

The present results suggest that DSC is a useful tool for the study of physicochemical properties of the mitochondrial membranes, but analysis of the data obtained by DSC should be made in the light of those obtained by other methods such as fluorimetry, ESR and NMR.

1. 緒 言

生体膜は、複雑な構造をもつ不均一なものと考えられるが、その動的構造を解析することは膜機能を知る手がかりとして重要である。生体膜の主構成成分は脂質とタンパク質であり、脂質としてはリン脂質が主体となりコレステロールと少量の糖脂質が加わっている。膜機能と直接関連している膜タンパク質の動きと、様々の酵素の活性発現のためには、脂質層の適当な流動性が必要である。

* 名古屋大学医学部解剖学第3講座：名古屋市昭和区鶴舞町65 〒466

Department of Anatomy, Nagoya University School of Medicine, 65, Tsuruma-cho, Showaku, Nagoya 466

** 理学電機株式会社分析センター：東京都昭島市松原町3-9-12 〒196

Rigakudenki Co. Ltd., Analitikal Center, 3-9-2, Matsubara-cho, Akishima, Tokyo 196

Differential Scanning Calorimetry (DSC)の生体膜への応用は、リン脂質の熱的性質に注目し、相転移の際の発熱、吸熱ピークの形状に基づき、膜の物理化学的性状を解析しようとするものである。しかし、生体膜構成成分の複雑さから、測定と、得られたデータの処理と解釈に困難が伴うため、非生物系と比べ基礎的なデータが乏しい。特にオルガネラに関する知見は極めて少ない。そこで本報では、ミトコンドリア膜を材料として、膜の状態と、DSCの発熱、吸熱ピークの位置と形状との相関を探る目的で諸条件下で測定を行ったので報告する。

2. 材料および方法

2.1 ミトコンドリアの調製

Wistar系ラット(雄, 5週令)を断頭屠殺し、肝を摘出して、Hogeboomら¹⁾の方法に従いミトコンドリアを分離。分離用液の組成は、20 mM HEPES (N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonic acid), pH 7.4, 70 mM ショ糖, 220 mM マンニトール, 0.1 mM

EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), 0.05% BSA (bovine serum albumin)。抽出肝に10倍量のメディウムを加えホモジナイズ後700gで10分遠心して得られた沈渣を3回洗ったものをミトコンドリア分画として本実験に用いた。外膜・内膜分画は, Schnaitman & Greenawalt²⁾の方法に従いジギトニン処理して得た。さらに一部の実験では, ミトコンドリアを超音波処理し105,000gで1時間遠心分離したものを膜分画として用いた。

2.2 ミトコンドリア脂質抽出

脂質の抽出は, Folch³⁾の方法に従った。ミトコンドリア(約50mg/cm³)に20倍量のクロロホルム・メタノール・HCl(200:100:1)を加え, 水中にて3時間攪拌後, 4℃で一晩放置後濾過。抽出液を0.2倍容の0.9% NaCl溶液と混和し分離した下層を集め, 溶媒を除去し乾固した脂質を総脂質として実験に用いた。又, コレステロール除去は, Colbeanら⁴⁾の方法に従いケイ酸カラムを用いて行った。

2.3 熱分析

ミトコンドリアを144,000gで1時間遠心し, 沈渣をSteim⁵⁾の方法に従い50%エチレングリコールに懸濁し, 再び144,000gで1時間遠心。得られたペレットを測定に用いた。試料パンは25mm³のアルミニウムパンを用い, ろ紙で表面の水分をふき取った試料を秤量し, 圧着法でシールした。抽出脂質は乾固後かきとり秤量し, 過剰のメディウムが充分浸透する様に24時間(4℃)放置。対照として, 2% Sephadex CT-200-50%エチレングリコールを用いた。測定は, 理学電機社製DSC8240と

大容量冷却ユニットを用い, インジウムを基準に較正した。昇降温速度, 5℃/min, range 1.046mJ/s, または2.092mJ/s, チャートスピード20mm/minで行った。heating, cooling共にピークのはじまりをT_i(initial transition temperature), ピークの頂点をT_m(maximum transition temperature), ピークの終わりをT_f(final transition temperature)とする。また, 生物試料の場合ベースラインを安定させることが困難であり, ピークの立ち上がり, ピークの終わりを明瞭にするため曲線定規を用いてベースラインを補正し, プロットし直した。熱的相転移に伴うエンタルピー(ΔH)は, チャート紙単位面積(100mm²)あたり,

$$\frac{\text{range (mJ/s)}}{\text{chart speed (mm/min)} \times \text{chart width (mm)}} \times 60 \text{ (s)} \times 10^2 \text{ mJ}$$

として求め, これをもとに切り抜き法で重量比から計算した。

3. 結果及び考察

3.1 ミトコンドリア

Fig.1に実験に用いたラット肝細胞内ミトコンドリア(A), 及び分離ミトコンドリア(B)の電顕像を示す。DSCの各測定は, 2回以上行い, 再現性が得られたが, 内外膜分画など, 充分量の試料を得るのが困難な分画は, 何度も測定を重ねることができなかった。Table 1に, ミトコンドリア分画, 膜分画, 抽出脂質分画のcoolingにおける脂質相転移のT_i, T_m, T_f-T_iの数値をまとめた。Fig.2は, ミトコンドリア分画のDSC heating

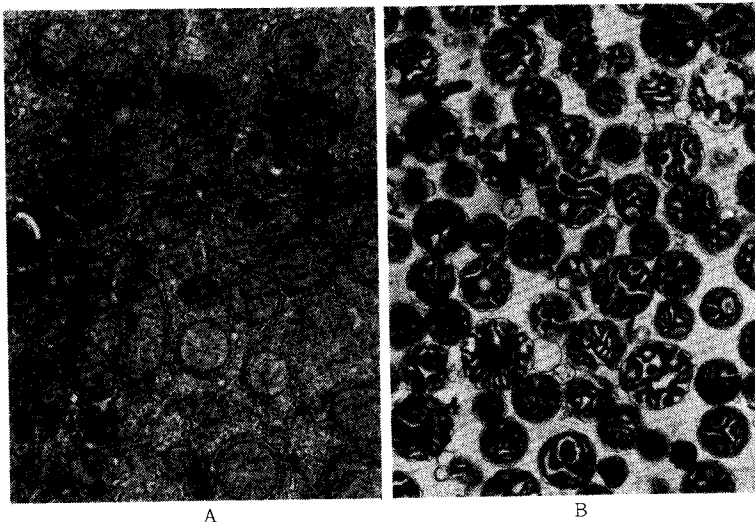


Fig. 1. Ultrastructure of mitochondria in rat hepatocytes (A, ×15,000) and isolated (B, ×15,000).

Table 1. Exothermic phase transition temperatures of rat liver mitochondria, sonicated mitochondria and extracted lipids suspended in 50% ethylene glycol at a cooling rate of 5°C/min and a range of 2.092 mJ/s. Data are the averages of three experiments (mean ± S.E.).

Fractions	T_i	T_m	T_f	$T_f - T_i$
	°C			K
Mitochondria	-2.5 ± 0.9	-10.8 ± 0.2	-30.7 ± 1.6	28.2 ± 1.1
Sonicated mitochondria	-3.5 ± 1.6	-11.7 ± 0.4	-32.8 ± 1.6	29.3 ± 0.2
Extracted lipids	-0.8 ± 0.4	-11.8 ± 0.6	-31.6 ± 1.9	30.8 ± 1.5

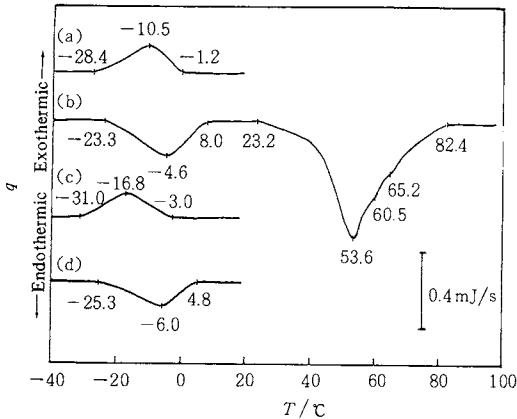


Fig. 2. DSC curves of rat liver mitochondria suspended in 50% ethylene glycol at a scanning rate of 5°C/min and a range of 2.092 mJ/s. (a) cooling; (b) heating; (c) cooling after denaturation of proteins; and (d) reheating after denaturation of proteins. The ordinate, q , represents the heat flow.

curve 及び DSC cooling curve の典型例である。heating では -4.6°C と 53.6°C に吸熱ピークが見られ、低温側のピークは脂質の相転移、高温側のピークは、タンパクの変性によるものと考えられる。再昇温により、脂質のピークは cooling で 6.3K, heating で 1.4K 低温側にシフトし、タンパク変性ピークは消失した。cooling の脂質の相転移による発熱ピークは、-10.5°C にあり、heating の吸熱ピークより約 6K 高温側にずれる。ΔH は、試料の重量をペレットの状態で測定したので、値が極めて小さく、比較することができなかった。相転移の幅 ($T_f - T_i$) は、発熱ピークより吸熱ピークの方が大であった。各条件下での T_m , $T_f - T_i$ は、cooling, heating で同様の傾向であった。これまで正常ミトコンドリアを用いての DSC 測定例は少ないが、Blazyk & Steim⁶⁾ によるものを最初として、Hackenbrock ら⁷⁾, Bach ら⁸⁾, Blazyk & Newman⁹⁾ などのデータが挙げられる。Blazyk & Steim⁶⁾ は、肝ミトコンドリア脂質の吸熱ピークは 0°C, タンパク変性ピークは 70°C にあり、脂質相

転移は、タンパク変性後も再現されると報告しているが、原著の図ではタンパク変性後の脂質相転移のピークはやや低温側にシフトしている。Hackenbrock ら⁷⁾ は、肝ミトコンドリアの脂質相転移の heating 及び cooling curve を示しているが、原著の図から推定すると、吸熱ピークが 6K 高温側にずれている。Bach ら⁸⁾ は、肝ミトコンドリア脂質及びタンパクの吸熱ピークは、それぞれ 15-40°C, 6°C 付近に見られ、タンパク変性後も脂質相転移のピークは再現されると報告している。Blazyk & Newman⁹⁾ は、牛心垂ミトコンドリア粒子について、脂質の相転移は -10°C 付近に吸熱ピークが見られるが、タンパク変性後は 20°C 付近にも新しいピークが現われると報告している。この様に、数少ない報告例でも脂質相転移温度に差がみられるが、試料側の因子としては、ミトコンドリア調製法、他のオルガネラの混入度などが、測定条件の因子としては、昇降温スピード、感度などが考えられる。

3.2 膜分画, 内・外膜分画

ミトコンドリアを超音波処理し、マトリックスを除いた膜分画 (Fig. 3), 及び内・外膜分画 (Fig. 4) の cooling, heating curve を示す。膜分画では、脂質相転移の T_i , T_f がミトコンドリア分画よりもやや低温側にシフトし、タンパク変性ピークはミトコンドリア分画でみられた主ピークが極めて小さくなっている。ミトコンドリア分画と同様タンパク変性後、脂質のピークは低温側にシフトした。また、脂質相転移のピーク幅がミトコンドリア分画と比べ大となり、ブロードなピークになっている。これらのことは、超音波処理により膜表面にイオン結合しているタンパクの減少と、粒子の径が小さくなったことによると推定される。外膜分画と内膜分画を比較すると、cooling 及び heating ではほぼ同じ位置にピークが見られる。ミトコンドリアでは、外膜と内膜とはタンパクと脂質の割合、タンパクの種類、リン脂質の極性基、脂肪酸、そしてコレステロール量など、膜の成分はかなり異なっているが、それぞれの成分の相互作用で膜全体としての脂質相転移温度は両者同じになる様に調節されていると思われる。

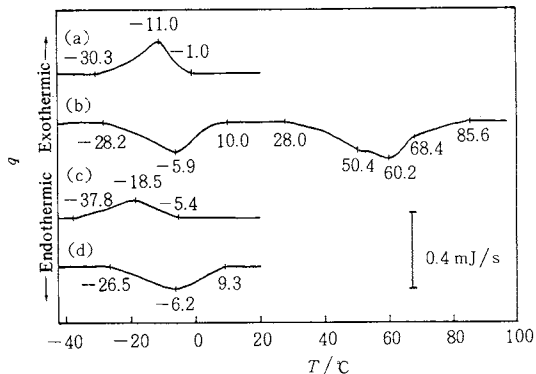


Fig. 3. DSC curves of sonicated rat liver mitochondria suspended in 50% ethylene glycol at a scanning rate of 5°C/min and a range of 2.092 mJ/s. (a) cooling; (b) heating; (c) cooling after denaturation of proteins; and (d) reheating after denaturation of proteins.

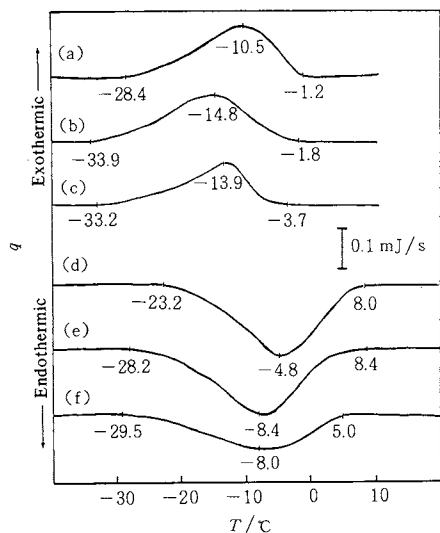


Fig. 4. DSC curves of rat liver mitochondria and submitochondrial fractions suspended in 50% ethylene glycol at a scanning rate of 5°C/min and a range of 2.092 mJ/s. (a, d) whole mitochondria; (b, e) outer membrane fractions; and (c, f) inner membrane fractions. Scan: (a, b & c) cooling; (d, e & f) heating.

3.3 エチレングリコールの影響

DSCでミトコンドリア膜の相転移温度を測定する場合、転移点がマイナス側にあるので、試料凍結防止のためエチレングリコールを用いるが、膜への影響を考え、測定可能な最低濃度が望ましい。エチレングリコール濃度を0~80%の各濃度で、脂質相転移、タンパク変性後のピークを検討した。両者では同様の傾向が見られた。脂質の T_m は試料凍結のため、heatingではエチレングリコール濃度0~30%、coolingでは0、15%で測定不能であった。Fig. 5は、エチレングリコール濃度15~80%のタンパク変性後の脂質のcoolingを示している。ピーク温度は、エチレングリコール濃度が高い程脂質相転移温度の下降がみられた。また、80%では、タンパク変性ピークは消失し、脂質相転移もエンタルピーの減少がみられた。高濃度のエチレングリコールは、膜への影響が大きいと考えられ、凍結防止のために用いるエチレングリコールの濃度は50%が適当と思われる。エチレングリコールによる脂質相転移温度の低温側へのシフトは、Steim¹⁰⁾により細菌膜で、Hackenbrockら⁷⁾によりミトコンドリア膜で報告されている。

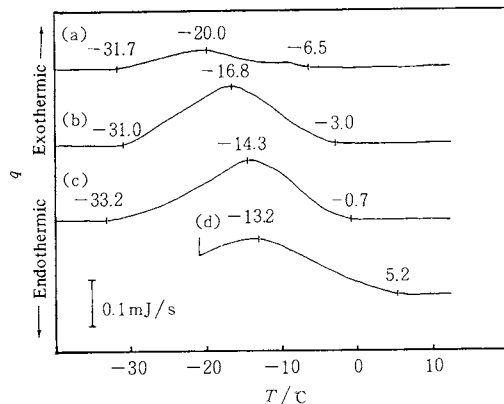


Fig. 5. DSC curves of rat liver mitochondria suspended in ethylene glycol at various concentrations after denaturation of proteins. Scanning rate: 5°C/min; Range: 2.092 mJ/s (a) 80%; (b) 50%; (c) 30%; and (d) 15%.

3.4 freezing-thawing後の試料

新鮮なミトコンドリアを直ちにDSC測定できない場合、凍結保存して後日測定に用いることが可能であれば都合が良い。本実験では、分離ミトコンドリアを調製後、-20°Cで凍結保存したもの、酵素活性測定などのために途中一度以上解凍した後凍結保存したものを解凍後50%エチレングリコールに懸濁し、新鮮ミトコンドリアと対比した(Fig. 6)。DSC曲線はcoolingおよびheating共に、一度凍結解凍したものでピークはやや低温側に、

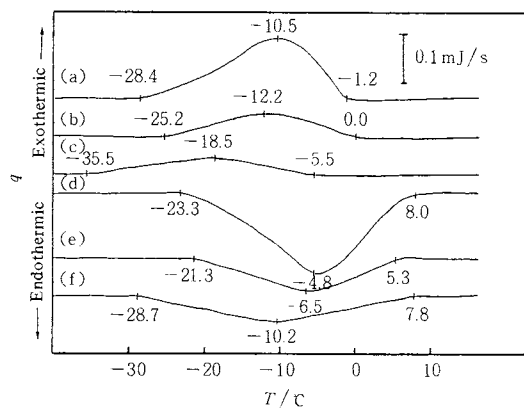


Fig. 6. DSC curves of rat liver mitochondria suspended in 50% ethylene glycol at a scanning rate of 5°C/min and a range of 1.046 mJ/s. (a, d) freshly prepared mitochondria; (b, e) once frozen-thawed mitochondria; and (c, f) repeatedly frozen-thawed mitochondria. Scan: (a, b & c) cooling; (d, e & f) heating.

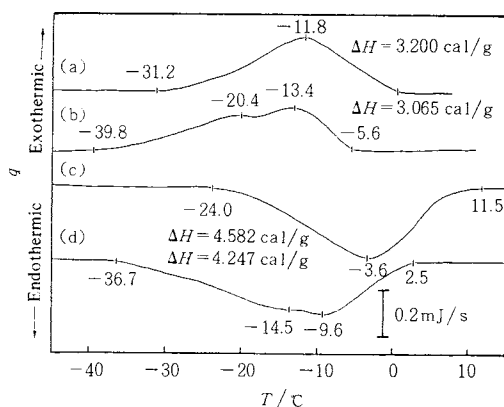


Fig. 7. DSC curves of lipid fractions extracted from rat liver mitochondria suspended in 50% ethylene glycol (3.0 mg of lipids + 20 mm³ of 50% ethylene glycol) at a scanning rate of 5°C/min and a range of 2.092 mJ/s. (a, b) total lipids; (b, d) after exclusion of cholesterol. Scan: (a, b) cooling; (c, d) heating.

二度以上凍結解凍したものではさらに低温側にシフトし、 $T_f - T_i$ は大となり、 ΔH は減少する傾向がみられた。凍結解凍による膜透過性の亢進、表面にイオン結合しているタンパクの遊離などが、DSC測定による脂質相転移温度の低温側へのシフトと ΔH の減少に一致したものと考えられる。以上から、少なくともミトコンドリア分画のDSC測定には新鮮なサンプルを用いなければならないことがわかった。

3.5 EDTAの影響

人工リン脂質膜では、Papahadjopoulosら¹¹⁾、Dijkら¹²⁾は、酸性リン脂質とCa²⁺の相互作用で脂質相転移温度の上昇と ΔH の減少を報告している。一方、ミトコンドリアの分離には、金属イオン、特にCa²⁺を取り除くためにEDTAが用いられる。そこで、EDTA存在下及び非存在下で分離したミトコンドリアを用いてDSC測定を行ったが、両者に明瞭な差は認められなかった。

3.6 ミトコンドリア抽出脂質

タンパクの影響を除いたミトコンドリア抽出脂質のDSC曲線をFig. 7 (a, c)に示す。抽出脂質では、 ΔH が膜に比べ大となったので計算し比較することができた。ミトコンドリア分画とほぼ同じ位値に T_m が見られ、 $T_f - T_i$ は増大した。また、 ΔH はcoolingよりheatingの方が大きな値を示した。Blazyk & Stein⁶⁾は、ミトコンドリア分画と比べ抽出脂質では T_m がわずかに低温側にシフトすると報告し、膜タンパクに疎水結合していた少量の脂質が、抽出脂質では解放され、相転移しやすく

なったと推定している。Bachら⁸⁾は、脂質相転移がミトコンドリア分画では15-40°C、抽出脂質では10-20°Cでみられたと報告している。一方、Blazyk & Newman⁹⁾は、牛心臓ミトコンドリア粒子で脂質相転移の主ピークは抽出前と同じ位置にあったと報告している。また、リポソームでは、Papahadjopoulosら¹³⁾により脂質とタンパクの相互作用を3つに分類した報告がある。すなわち、①酸性リン脂質と水溶性の塩基性タンパクの静電的結合、②水溶液中から一部だけ膜に侵入した疎水性の相互作用、③不溶性のリポタンパクと脂質膜の強い疎水性の相互作用、である。①の場合は、リン脂質極性基の配列がより規則性をもつため T_m は上昇、 ΔH 増大、②の場合は、膜に侵入した部分が構造を乱す結果 T_m 低下、 ΔH 減少、③の場合には膜にくり込まれたタンパクの疎水部分と、そのまわりの脂質が強く結合し、他の脂質とは性質が異なるため、 T_m は不変、 ΔH は減少する。今回のミトコンドリア抽出脂質では、タンパク除去後脂質相転移温度は不変であったが、膜タンパクが脂質相転移温度に関わっていないと考えるよりも、前述のリポソームにおけるタンパクとの相互作用の様に、膜中の、作用の仕方が異なるタンパクの各作用が打ち消し合っていたと考えの方が自然であろう。

3.7 コレステロールの影響

細胞膜と比べはるかに少量ではあるが、ミトコンドリア外膜にもコレステロールが存在する。本実験では、ミトコンドリア膜のコレステロールの脂質相転移に及ぼす

影響を調べる目的で、ミトコンドリアの抽出脂質と、この総脂質からコレステロールを除去した脂質を比較した (Fig. 7)。コレステロール除去後では、除去前に比べ cooling, heating 共に T_m は下がり、 $T_f - T_i$ は増大し、ピークが2つの山に分かれ、 ΔH は減少した。一般に、コレステロールは生体膜の流動性を調節していると考えられている。今回のミトコンドリア膜の結果からは、リン脂質のみで起こる膜脂質の相分離をコレステロールは防ぎ、膜を均一に保つようにも働いていると推定される。Madden¹⁴⁾らは、ラット肝ミトコンドリア内膜分画にコレステロールを取り込ませ、DSC測定を行ったところ、コレステロール含有量増加に伴い相転移温度は低温側にシフトすると共に、 ΔH が減少したと報告している。一方、リン脂質人工膜に対するコレステロールの影響については、Blume¹⁶⁾はホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンの単独リポソームにコレステロールを添加することによって T_m は下がり ΔH は減少すると報告している。我々が今回得たミトコンドリア抽出脂質を用いてのコレステロールの効果と、Maddenら¹⁴⁾、Blume¹⁵⁾の報告とは一致しない。これは、コレステロールの膜に対する作用の複雑さを示すものであり、もともとコレステロールを有しない生体膜にコレステロールを加えた場合、コレステロールをもつ膜にさらに添加した場合、除いた場合、また単一組成リポソームに加えた場合、などそれぞれの現象が一致しないことを意味する。

3.8 生体膜の物理化学的性状解析手段としての DSC の意義

他の分野に比して、生体膜系への DSC の応用はまだ一般的ではなく、特にミトコンドリア膜に関するデータが乏しい。膜機能に関連している膜の物理化学的性状を探る方法として、DSC の他に ESR, NMR, 蛍光法な

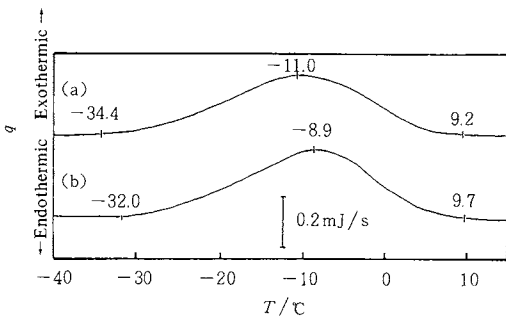


Fig. 8. DSC curves of lipid fractions suspended in 50% ethylene glycol, extracted from hydrazine-fed rat liver mitochondria, in the absence (a) and the presence (b) of Ca^{2+} . Scanning rate: 5°C/min; Range: 2.092 mJ/s.

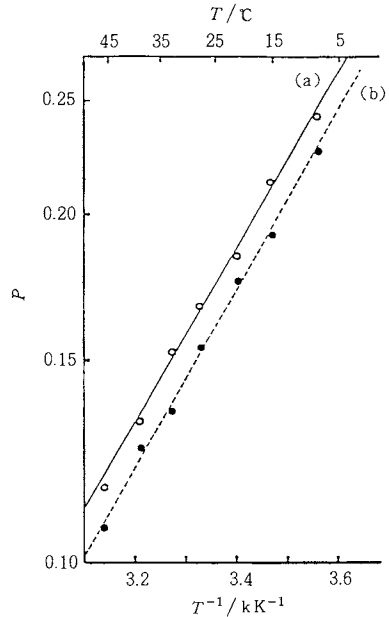


Fig. 9. Effects of Ca^{2+} on the temperature-dependent fluorescence polarization, P , of DPH (1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene) in lipid fractions extracted from hydrazine-fed rat liver mitochondria in the absence (a) and the presence (b) of Ca^{2+} .

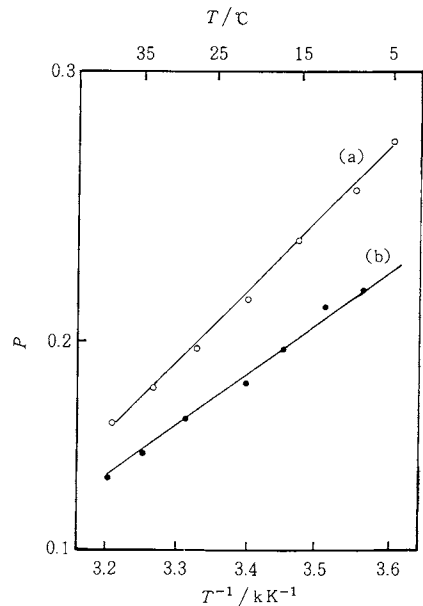


Fig. 10. Temperature-dependence of the fluorescence polarization, P , of DPH in rat liver mitochondria (a) and extracted lipids (b).

どがあるが、単一の手段を用いて結論するのは危険である。例えば、DSC 測定により脂質相転移温度の低下と ΔH の減少を認めた場合、直ちに膜流動性の上昇と結びつけて解釈する傾向がみられるが、必ずしも一致しない例がいくつか挙げられる。ヒドラジン投与ラット肝のミトコンドリア抽出脂質に Ca^{2+} を加えると、 T_m の高温側へのシフト傾向が見られるが、同時に蛍光法によって測定した膜の流動性は高くなっている (Fig. 8, 9)。また、ミトコンドリア膜とその抽出脂質について DSC により脂質相転移温度には差は認められないが、蛍光法による膜流動性は抽出脂質の方が高い (Fig. 1, 10)。膜の相転移温度を明瞭に捉えるには、DSC が最良の方法と思われる、膜脂質の協同性、相分離の状態も捉えることができる。今後、諸条件下で生体膜系での DSC 測定を重ねると同時に他の測定手段と絶えず対比させることにより、DSC で得られたデータの意味づけがより明確となり、有効に用いることができるようになると思われる。

文 献

- 1) D. E. Hogeboom, W. C. Schneidel and G. E. Plade, *J. Biol. Chem.* **172**, 619 (1948).
- 2) C. Shnaitman and J. W. Greenwalt, *J. Cell. Biol.* **38**, 158 (1968).
- 3) J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath and F. N. LeBaron, *J. Biol. Chim.* **191**, 801 (1951).
- 4) A. Colbean, J. Nachbauer and P. M. Vignais, *Biochim. Biophys. Acta* **249**, 462 (1971).
- 5) J. M. Steim, *Methods in Enzymol.* **32**, 262 (1974).
- 6) J. F. Blazyk and J. M. Steim, *Biochim. Biophys. Acta* **266**, 737 (1972).
- 7) C. R. Hackenbrock, M. Höhli and R. M. Chau, *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 466 (1976).
- 8) D. Bach, I. Bursuker and I. R. Miller, *Experimentia* **34**, 717 (1978).
- 9) J. F. Blazyk and J. L. Newman, *Biochim. Biophys. Acta* **600**, 1007 (1980).
- 10) J. M. Steim, M. E. Tourtellotte, J. C. Reinert, R. N. McElhaney and R. L. Rader, *Biochemistry* **63**, 104 (1969).
- 11) D. Papahadjopoulos and A. Portis, *Annals New York Academy of Sciences* **308**, 50 (1978).
- 12) P. W. M. Van Dijck, B. De Kruijff, A. J. Verkleij and L. L. M. Van Deenen, *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 84 (1978).
- 13) D. Papahadjopoulos, M. Moscarello, E. H. Eylar and T. Isac, *Biochim. Biophys. Acta* **401**, 317 (1975).
- 14) T. D. Madden, C. Vigo, K. R. Bruckdorfer and D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **599**, 528 (1980).
- 15) A. Blume, *Biochemistry* **19**, 4908 (1980).