

解 説

農薬のターゲットとしてのエネルギー獲得系

—エネルギー産生のしくみとその阻害剤—

寺田 弘, 篠原康雄

徳島大学薬学部

(昭和 61 年 8 月 20 日受理)

Mechanism of Energy Transduction in Biological Systems and Action Mechanism of Inhibitors

Hiroshi TERADA and Yasuo SHINOHARA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima,
Shomachi, Tokushima 770, Japan*

はじめに

生物がエネルギーを産生することは生命活動を営むうえで必須の条件である。生物エネルギーは ATP (アデノシン-5'-三リン酸) によって一般に供給される。つまり ATP は生物界において共通のエネルギー通貨であり、ATP が合成されないならば生命活動はただちに停止されてしまう。したがって、エネルギー産生系に阻害的に働く物質は農薬として有用であることが期待される。事実、殺菌剤、除草剤などのなかには ATP 合成の阻害に基づいて薬理効果を発現しているものが少なくない。本稿では、生物界において ATP がどのようなしくみで合成され、また、その阻害様式はどのような機構に基づいているかについて簡単な解説を試みる。

生物はそのエネルギー獲得のメカニズムによって大きく二つに分類することができる。一つは、独立栄養生物であり、もう一つは従属栄養生物である。独立栄養生物は、植物および光合成細菌など光合成により、光エネルギーを利用して有機化合物の合成を行なっているものの総称である。一方、従属栄養生物は光合成によって得られた有機化合物を酸化し、エネルギーを獲得しているもので、すべての動物および一部の植物、細菌を含んでいる。

それぞれの生物において、上述のようなエネルギー獲得は、細胞内の特定の器官でなされている。独立栄養生

物においてこの働きを担っているのはおもにクロロプラスト (葉緑体 chloroplast) であり、従属栄養生物ではミトコンドリア (mitochondria) である。また、原核細胞では細胞自身がこの働きをしており、これらを総称してエネルギー転換膜系と呼んでいる。それぞれのエネルギー転換膜系において、最初に与えられるエネルギーの形は、ミトコンドリアや原核細胞では呼吸基質、またクロロプラストでは光 ($h\nu$) といったぐあいに多様であるが、エネルギー転換膜系では、基質や光のエネルギーによる連続した酸化還元反応を司る電子伝達系と、ADP のリン酸化の場となる ATP 合成酵素とが共通に存在する。

エネルギー転換の機構として現在広く受け入れられている化学浸透圧説 (chemiosmotic theory)^{1,2)} によると電子伝達系は、与えられたエネルギーを利用して、膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャル (これを $\Delta\mu H^+$ と表す) を形成する。このエネルギーが ATP 合成や、膜を隔てた溶質の輸送、あるいは、有機分子の生合成、さらには機械運動のエネルギーに用いられている。ここで、 H^+ の電気化学ポテンシャル ($\Delta\mu H^+$) は、膜電位の項と濃度項よりなり、式 (1) で与えられる。

$$\Delta\mu H^+ = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F} \Delta pH \quad (1)$$

なお、 R は気体定数、 T は絶対温度、 F はファラデー定数であり、 $2.3RT/F$ は常温で約 60 mV となる。 $\Delta\mu H^+$ は $\Delta\psi$ と ΔpH とをそれぞれ実測することによって求め

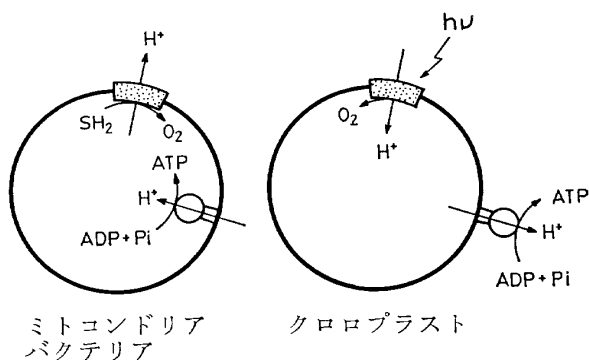


図1 反応の方向性をもったエネルギー産生膜系
 SH_2 は呼吸基質を, $h\nu$ は光のエネルギーを, 枠で囲んだ部分は電子伝達系を, ○はATPaseをそれぞれ表わしている。

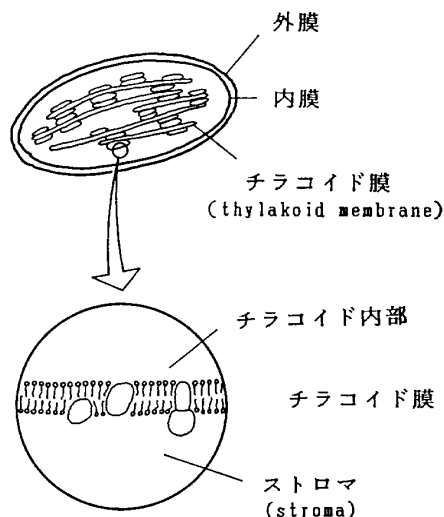


図2 クロロプラスト (葉緑体) の微細構造

ることができる。通常, 生理条件下で, ミトコンドリアの内部の pH は 7.8 程度, 外部が pH 7 程度であり, $\Delta\mu\text{H}^+$ は約 -200 mV であるが, クロロプラストではチラコイド膜の内部が pH 5 程度, 外部が pH 8 程度であり, 300 mV 程度の $\Delta\mu\text{H}^+$ が形成されている³⁾。

各膜系でのエネルギー獲得のメカニズムの第一の相違は図1に示したように膜の方向性にみられる。大腸菌などのバクテリアや, ミトコンドリアでは, H^+ は膜外に放出され, 内側は負に荷電するが, クロロプラストでは光エネルギー($h\nu$)を得ることによって H^+ は内側に取り込まれ内側が正の電位をもつわけである。

本稿では, 独立, 従属栄養生物におけるエネルギー産生のしくみとそれらの相違点を述べ, 次に獲得したエネルギーの利用による, 生物生存のための働きについて検討し, 最後に, エネルギー産生系の阻害剤について述べる。

エネルギー産生系の各成分

1. 電子伝達系

先に述べたようにクロロプラストとミトコンドリアではエネルギー供与体が異なるため, 電子伝達系を構成する成分は, いくぶん異なっている。しかし, 膜を介した電気化学ポテンシャル差を形成する点では同じである。

クロロプラストは, 図2に示すように, 3層の膜構造からなっている。このうち, いちばん内側の膜に相当するのがチラコイド膜であり, 光合成に関与するすべての色素タンパク質, および ATP 合成酵素を含んでいる。チラコイド膜には, 光エネルギーを獲得すべく, アンテナの役割をしているフェオポルフィリン (pheoporphyrin) 骨格をもったクロロフィル (chlorophyll, 図3)と, いくつかの補助色素 (カロチノイド) が存在する。これらの

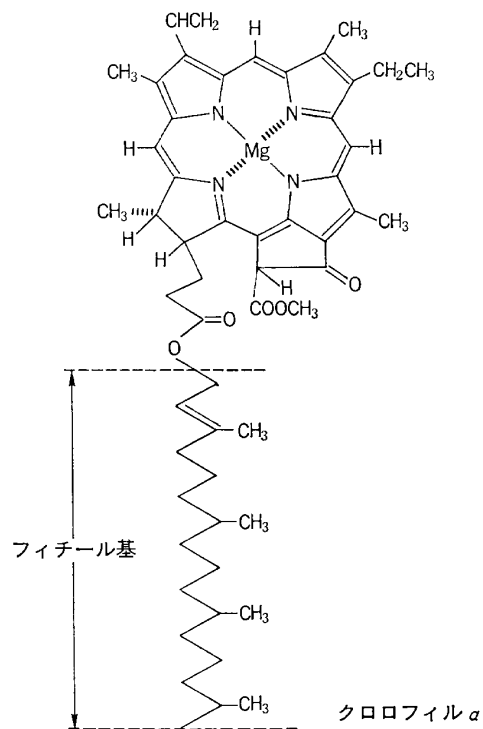


図3 アンテナ分子の代表, クロロフィル

アンテナ分子は光エネルギーを分子内共役結合の励起によって獲得し, このエネルギーをクロロフィル *b* を分子内にもったタンパク質 *P-680* に伝える。*P-680* は光化学系 II (photosystem II, PS II) の反応中心 (reaction center, RC) であり, この光エネルギーの吸収により高エネルギーレベルとなり, 電子を放出し, 同時に他の酸化還元成分 (プラストキノン, チトクローム *P-559*, チトクローム *f* など) を, 酸化還元電位に従って順次還元する。光化学系 II の最終成分であるプラストシアニンに電子が渡されると, この電子はさらに光化学系 I (PS I) の RC

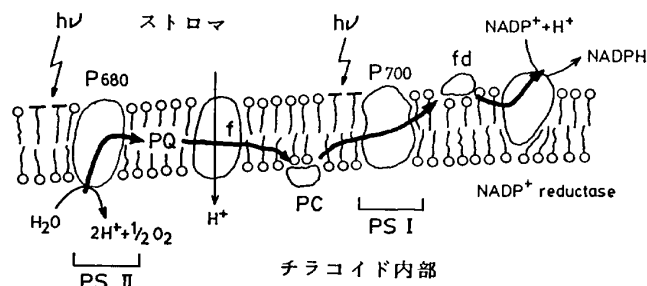


図4 クロロプラストにおける電子伝達系

はアンテナ分子（クロロフィル，カロチノイド）を PQ, PC, fd はそれぞれプラストキノン，プラストシアニン，フェレドキシンを示す。

でありクロロフィル *a* (Chl *a*) を含んだ，*P*-700 と呼ばれるタンパク質に渡され，PS I は再び光エネルギーによって励起される。励起された *P*-700 は *P*-680 と同様にフェレドキシン，フラビンタンパク質へと，順次電子を伝達する。以上の過程を模式的に図4に示してある。この過程で，チラコイド膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャルが形成されるとともに，高い負の酸化還元電位をもった化合物 NADPH が形成される⁴⁾。

光合成細菌においては，以上述べてきたようなクロロプラストにおける電子伝達系と類似した系が存在するが，クロロフィルの代わりに，バクテリオクロロフィル (Bchl) が共通して用いられている。好塩細菌（ハロバクテリア，*Halobacterium*）では紫膜 (purple membrane) がエネルギー獲得の器官であるが，この紫膜はレチナール (retinal) またはビタミン A アルデヒド (vitamin A aldehyde) を含んだタンパク質，バクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin, 26k-dalton) を有している。バクテリオロドプシンは，現在知られている最も単純な光駆動性 H^+ ポンプであり，光エネルギーから ATP 合成のエネルギー（電気化学ポテンシャル）を直接得ている（図5）。その分子構造や作用機作は，かなり明確にされており，他のエネルギー転換膜系の営みを解明するのに大いに役立つものと期待されている^{5,6)}。

一方，動物をはじめとする従属栄養生物でのエネルギー産生器官はミトコンドリアである。ミトコンドリア（図6）は，内，外膜の二層構造をとっており，そのうち内膜において酸化的リン酸化反応が行なわれている。ミトコンドリア内膜には，呼吸鎖とも呼ばれる電子伝達系が存在し，クロロプラストのそれと同様に，酸化還元電位に従って電子の伝達が行なわれる。呼吸鎖におけるエネルギー供与体は呼吸基質そのものである。呼吸基質は有

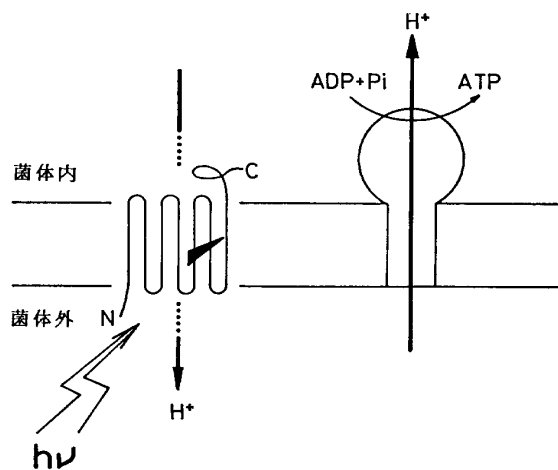


図5 ハロバクテリアにおけるバクテリオロドプシンのエネルギー捕獲反応と ATP 合成反応

はレチナール分子を示す。

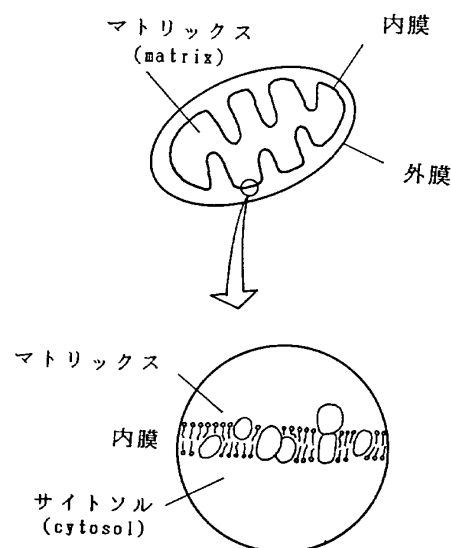


図6 ミトコンドリアの微細構造

機分子の異化経路の一つである嫌氣的発酵，すなわち解糖およびそれに引き続いたトリカルボン酸サイクル (TCA cycle) の結果生じた化合物群である。これらの呼吸基質は，それぞれに見合った酸化還元電位をもった構成成分によって酸化され，エネルギーを供給している。たとえばピルビン酸やリンゴ酸では，ピリジン系デヒドロゲナーゼと称される酵素に電子を供給する。この電子は上述のごとく，酸化還元電位に従って，フラビンタンパク質，ユビキノン，鉄イオウタンパク質に伝達され，次いでポルフィリン化合物を補欠分子族としたタンパク質であるチトクローム *b*, *c*₁, *c* へと伝達される。最後に，呼吸鎖の最終構成成分であるチトクローム *aa*₃ から酸素へと受け渡される。以上の電子伝達系によって膜を介した3個の H^+ の放出に伴い，電気化学ポテンシャルが形

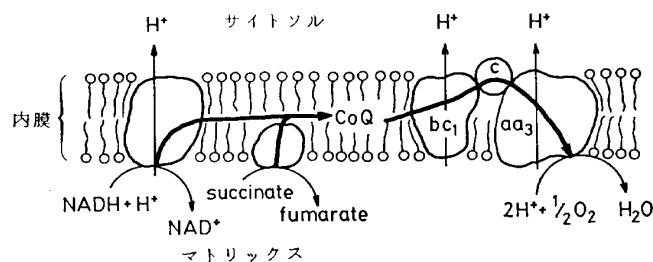


図7 ミトコンドリアにおける電子伝達系(呼吸鎖)
CoQは補酵素Q (ユビキノン)を示す。

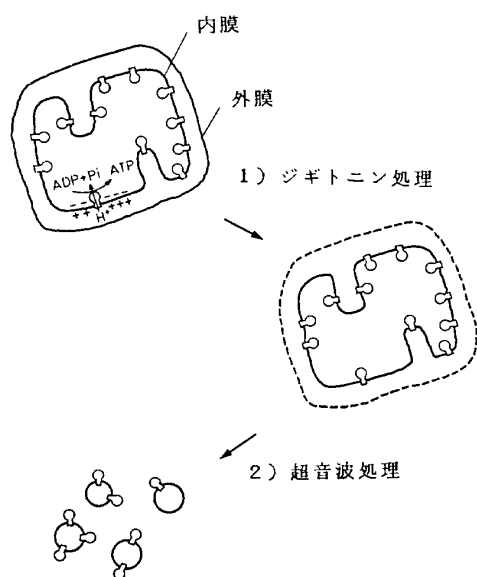


図8 嵴ミトコンドリア粒子の調製

ミトコンドリアをステロイド骨格をもつ、緩
和な作用をもつ界面活性剤ジギトニンで処理
すると外膜を破碎することができる(1)。さ
らに、これを超音波処理(sonication)するこ
とによって(2)反転膜小胞、嵴ミトコンド
リア粒子となる。

成され、これが後述のように、ATP合成や溶質輸送の
エネルギー源として用いられるわけである。ミトコンド
リアにおいて現在明らかにされている電子伝達メカニズ
ムの概略を図7に示した。

ミトコンドリアにおける電子伝達や、ATP合成のメ
カニズムを調べる目的で調製される膜小胞として、嵴ミ
トコンドリア粒子(submitochondrial particles, 図8)が
ある。この粒子は、ミトコンドリアを超音波処理するこ
とによって調製され、得られた標品は酸化的リン酸化能
(電子伝達、およびそれに共役したATP合成能)を有し
ているが、ミトコンドリアに対し反転した(inside-out)膜
タンパク質の配向性をもつことを特徴としている。それ
ゆえに、嵴ミトコンドリア粒子は膜酵素の膜内における

立体的分布、すなわち、配向性の決定や、薬物の作用機
作の検討にしばしば用いられる⁷⁾。

2. ATP合成のメカニズム

前項で述べてきたように、光合成や呼吸基質の酸化反
応による電子伝達系は、供与されるエネルギーを、それ
ぞれの膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャル差の形に
蓄える。この電気化学ポテンシャル差がATP合成や、
溶質輸送のエネルギー源として用いられているわけであ
る。ATPは、それぞれの膜に存在する、ATP合成酵素
(一般に H^+ -ATPaseと呼ばれる)によって、電気化学ポ
テンシャル差 $\Delta\mu H^+$ をもとに、環境中のADPと無機リン
酸(Pi)から形成される。この H^+ -ATPaseは近年、遺
伝子工学を利用したDNAの塩基配列の決定により精力
的に解析が進められている⁸⁾。

現在得られている知見によるとバクテリア、ミトコン
ドリアあるいはクロロプラストの膜において H^+ -ATPase
はATPの合成および加水分解を司っている。この酵素
は、数種のサブユニットからなるオリゴマータンパク質
であり、膜から突出した F_1 (coupling factor 1)と呼ば
れる部分と、膜を貫通した F_0 と呼ばれる部分とからな
っており、 F_1F_0 タイプのATPaseと呼ばれている。本
酵素は、クロロプラストではそれぞれ CF_1 、 CF_0 と呼ば
れている。ATPの合成は、膜を介した H^+ 勾配による
ポテンシャルに従って H^+ が F_1 、 F_0 中を流れることによ
って、 H^+ -ATPaseにおいて何らかのコンホーメーシ
ョン変化が生じ、これによって F_1 に結合したADPと
PiがATPに変換されると解釈されている。しかし、 H^+
の動きが逆方向になると、ATPaseとしての活性が発現
する。つまり、 H^+ -ATPaseはATPの合成と分解とい
う相反する機能をともに有している。 H^+ -ATPaseの構
造を図9に示す^{8~10)}。

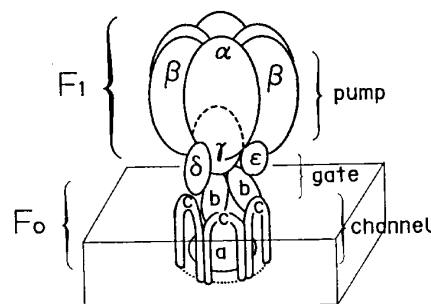


図9 バクテリアの H^+ -ATPaseの構造

F_1 は $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ の五つのサブユニットからなり、
 F_0 は abc の三つのサブユニットから構成さ
れている。 F_1 はcatalytic siteとして機能し
 F_0 は膜を貫通し H^+ channelを形成してい
る。

獲得されたエネルギーによる溶質の輸送

生体膜を介した溶質の輸送は電気化学ポテンシャルに従った、受動的 (passive) なものと、逆らった能動的 (active) なものに分類される。前者は輸送にエネルギーを必要としないが、後者では、電気化学ポテンシャルに逆らった能動輸送を可能にするためにエネルギーが必要である。ここでは、獲得されたエネルギーを用いて行なわれる能動輸送について述べる。

溶質の輸送に必要なエネルギーは、その溶質 S の膜を隔てた電気化学ポテンシャル差、 $\Delta\mu_S$ であり、溶質の膜の外側、内側の濃度をそれぞれ S_o , S_i , 電荷を m とするとき式 (2) で与えられる。

$$\Delta\mu_S = RT \cdot \ln \frac{S_o}{S_i} + mF\Delta\phi \quad (2)$$

ここで、 $\Delta\mu_S$ が負の値をとるとき、このエネルギーを周囲から与えてやることによって、電気化学ポテンシャルに逆らった溶質の輸送が観察され、能動的な輸送が行なわれたといわれる。溶質の輸送にこのようなエネルギーを必要とする能動輸送は、エネルギーの供給源によってさらに二つに分類される。一つは ATP やフォスホエノールピルビン酸 (phosphoenolpyruvate) などの高エネルギー化合物の加水分解のエネルギーを利用した輸送系で一次的輸送と呼ばれるものである。もう一つは一次的輸送の結果生じた、ある種のイオンの電気化学ポテンシャルを利用した他の溶質の輸送で二次的輸送と呼ばれる。

1. 一次的輸送

生合成された ATP のもつエネルギーを利用した溶質の輸送は溶質の細胞内、あるいは器官内における濃度維持に非常に重要な役割を担っている。たとえば、筋肉細胞におけるアクトミオシンは、細胞内の Ca^{2+} 濃度が 10^{-5} M 以上では収縮し、それ以下では弛緩することがわかっている (図 10)。この Ca^{2+} 濃度調節の目的で筋肉細胞内の筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) には非常に多くの Ca^{2+} -ATPase が存在し、ATP 加水分解のエネルギーを利用して Ca^{2+} 濃度の調節、すなわち、筋収縮を調節している。また、神経などの興奮性組織の膜電位の維持や、生体におけるイオン分布の恒常性維持のためには、 Na^+ と K^+ の濃度勾配が必要である。たとえば、ほとんどの細胞内における K^+ 濃度は相対的に高く、 Na^+ 濃度は低い。解糖系の酵素のいくつかは、酵素活性発現に細胞内に豊富に存在する K^+ を必要としており、これは Na^+ で置き換えることはできないことが明らかになっている。 Na^+ , K^+ -ATPase (たんに Na^+ , K^+ ポンプとも

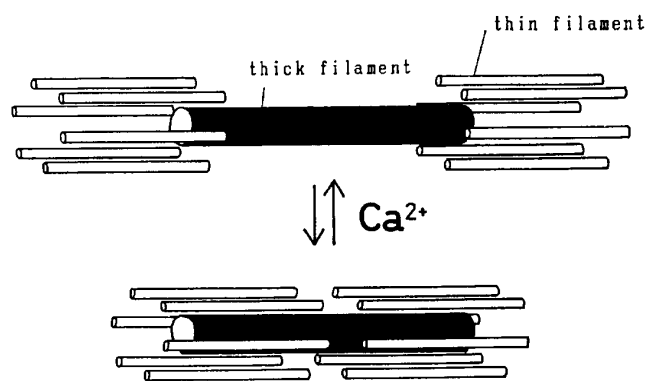


図 10 Ca^{2+} による筋収縮の調節

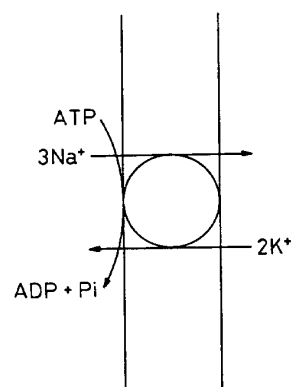


図 11 Na^+ , K^+ -ATPase とイオン移動

Na^+ , K^+ -ATPase は ATP 加水分解のエネルギーを利用して、細胞膜を介した Na^+ , K^+ の濃度勾配維持を行なっている。

と呼ばれる) は ATP の加水分解のエネルギーを利用して、 Na^+ を外にくみ出し、 K^+ を中に取り込むことによって、この濃度勾配を維持している (図 11)。 Ca^{2+} -ATPase と Na^+ , K^+ -ATPase のような ATP 利用系の ATPase は ATP を加水分解する際に、酵素がリン酸化を受け EP というリン酸化中間体を形成することで、 F_1F_0 タイプの ATPase と区別されている。これら二種の ATPase も最近 cDNA の塩基配列からアミノ酸配列が明らかにされた^{11~13)}。

2. 二次的輸送

二次的 (能動) 輸送は、一次輸送の結果生じたイオンの電気化学ポテンシャルを利用して、おもに生命維持に不可欠な有機栄養物を輸送するものである。このような輸送系は、バクテリアや小腸の上皮細胞など有機栄養分子の取り込み器官において、よく発達している。たとえば、小腸上皮細胞におけるアミノ酸輸送やグルコース輸送は、先に述べたような Na^+ の濃度勾配を利用してなされる¹⁴⁾。すなわち、 Na^+ の透過により形成される電気化学ポテンシャル $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ がこれらの有機栄養分子の透

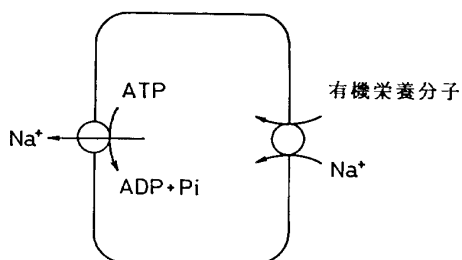


図12 Na^+ 勾配を利用した有機栄養分子の細胞内への取り込み

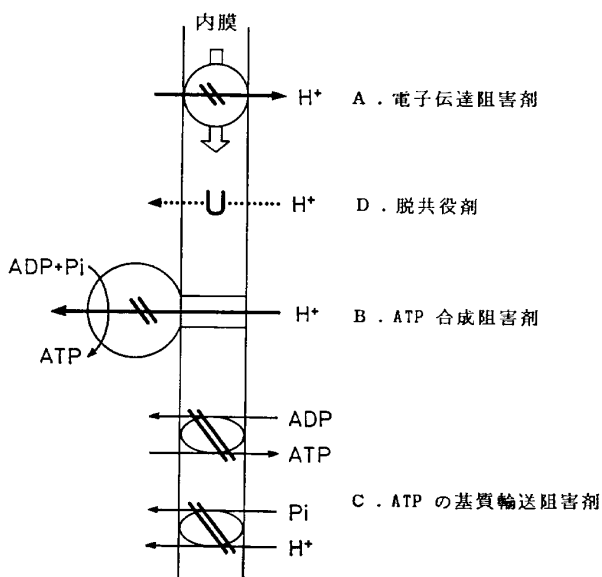


図13 エネルギー産生系の阻害剤

過の推進力となる(図12)。 Na^+ の濃度勾配を形成する酵素(Na^+ ポンプ)が存在しないようなバクテリアでは、 Na^+ 勾配の代わりに H^+ の勾配が利用され则认为られている。

また、先に述べたように、酸化リン酸化は H^+ の電気化学ポテンシャル差を駆動力としているが、ごく最近 *Vibrio alginolyticus* が Na^+ の電気化学ポテンシャル差 $4\mu\text{Na}^+$ を利用して生育していることが明らかにされ注目を集めている¹⁵⁾。

エネルギー産生系の阻害剤

以上述べてきたような生体内でのエネルギー産生、利用の過程は、それぞれのステップでの阻害剤の発見によって著しく解明された。エネルギー産生系の阻害は、図13に示す、どの部位を阻害することによっても行なわれる。すなわち、阻害剤は主として、A) 電子伝達系の阻害剤、B) ATP合成系の阻害剤、C) ATPの基質(ADP, Pi)の輸送系の阻害剤、D) 脱共役剤と分類することができる。これらの阻害剤の多くは生命活動の源であるエネ

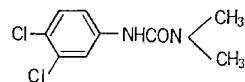
表1 エネルギー産生系の電子伝達阻害剤

Hydroxylamine



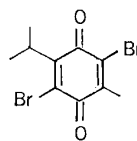
DCMU

(*N*-Dichlorophenyl-*N'*-dimethylurea)

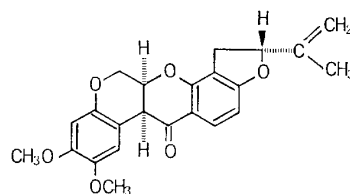


DBMIB

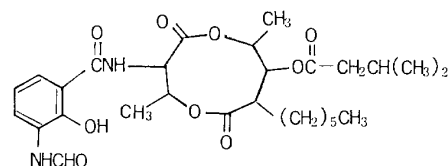
(Dibromo-methyl-isopropyl-*p*-benzoquinone)



Rotenone (394.41)



Antimycin A (548.62)



CN^- , CO, NaN_3

類縁体がある場合には、最も代表的なものを示した。()内は分子量を示す。また名称の後に+のついたものは市販されていない。(以下、表4まで共通)

ルギー産生反応を阻害するのであるから、生物に対して毒性を示し医薬品として用いられているものはほとんどなく、農薬とくに、除草剤、殺ダニ剤などとして用いられている場合が多い。以下、各阻害剤の特徴につき、例をあげながら述べる。なお、物質輸送など、エネルギー利用系の阻害剤については紙数の関係で本稿ではふれず、文献を参考に記すにとどめる¹⁶⁾。

1. 電子伝達阻害剤

電子伝達阻害剤の主なものを表1に示す。このうちヒドロキシアミン、DCMU、DBMIBはクロロプラストでのみ有効で、ロテノン、アンチマイシンA、CO、 NaN_3

はミトコンドリアでのみ有効であるとされている。

ヒドロキシルアミン (NH_2OH) は水分子から電子の受け渡しが行なわれ *P*-680 へと電子が流れるのを阻害する。DCMU と DBMIB はそれぞれプラストキノン (PQ, 図 4 参照) の前後で電子伝達を阻害する。

ロテノン (rotenone) は南米産デリス根の殺虫成分であり、古く 1902 年に Nagai¹⁷⁾ によって単離され、1932 年に Takei ら¹⁸⁾ によって構造決定がなされた化合物である。この化合物は NADH から CoQ への電子伝達を阻害する。その阻害様式は NADH デヒドロゲナーゼと脂質分子への強固な結合によるものとされているが詳細については明らかでない。

一方、アンチマイシン A (antimycin A) は放線菌の一種である、*Streptomyces griseus* より単離された、抗生物質であり、チトクローム *b* の酸化を阻害する。この効果はミトコンドリアから単離されたチトクローム還元酵素 (cytochrome *c* reductase, 複合体 III) においても確認されている¹⁹⁾。さらに、アジド誘導体を用いて、その結合サイトに関する研究もなされはじめている²⁰⁾。

ミトコンドリア、クロロプラストともに効果をもった CN^- は、ミトコンドリアではチトクローム aa_3 の電子伝達を、クロロプラストでは PC から *P*-700 への電子伝達をそれぞれ阻害する働きをもっている。

2. ATP 合成阻害剤

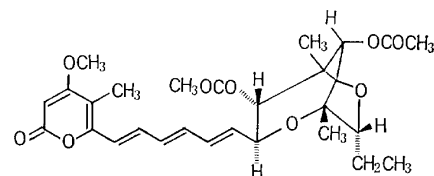
エネルギー転換膜系においては ATP 合成が F_1F_0 タイプの ATPase で行なわれ、各膜系間での homology は相当に保たれているため、ミトコンドリア、クロロプラスト、バクテリアいずれの膜系でも同じ阻害剤が有効である場合が多い。表 2 に主な ATP 合成阻害剤を示した。

オーロバーチン (aurovertin) は *Calcarisporium arbuscula* の産生する抗生物質であり、 F_1 に結合して ATPase 活性を阻害する。 F_1 における結合サイトは、 β サブユニットにあるとされており (図 9 参照)、結合時に強い蛍光が発されるため、結合の化学量論的决定や ATP 合成、分解の際のリガンド結合による F_1 のコンフォメーション変化の測定に用いられている。

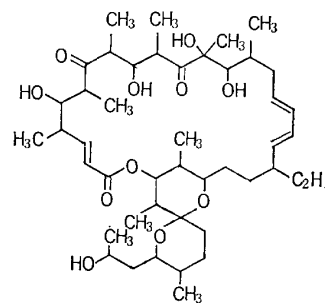
オリゴマイシン (oligomycin)²¹⁾ は *Streptomyces diastatochromogenes* の産生する抗生物質であるが、オーロバーチンと異なり可溶化された (soluble な) F_1 -ATPase の活性は阻害しないが、膜に結合した intact な状態の ATPase を阻害する。一方、DCCD はスクレオチドやペプチドの化学合成の際に用いられる縮合剤であるが [^{14}C]DCCD を用いた実験から、タンパク質のグルタミン酸残基のカルボキシル基に特異的に共有結合することによって、このアミノ酸を不活化することが知られてい

表 2 エネルギー産生系の ATP 合成阻害剤

Aurovertin⁺ (490)



Oligomycin (802)



DCCD (206.3)

(*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide)

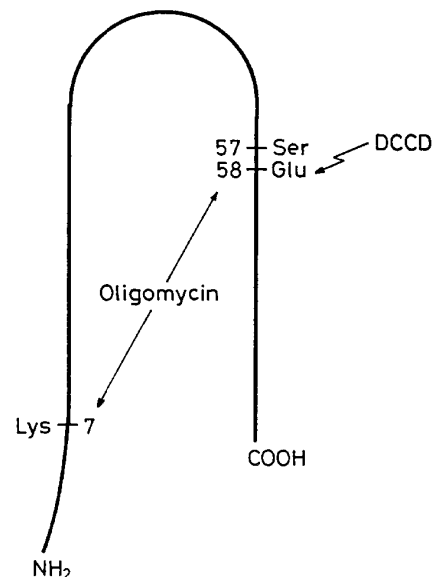
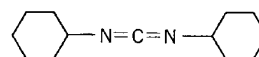


図 14 オリゴマイシンと DCCD の作用部位としての 8k-dalton タンパク質 (DCCD 結合プロテオリピド)

図 9 の c サブユニットに相当する。

る。オリゴマイシンと DCCD は、ともに F_0 部位の分子量約 8000 の疎水性タンパク質 (DCCD 結合プロテオリピド) に作用して H^+ の流れを阻害し、かつ、 F_1 -ATPase

のコンフォメーションに変化を与え²²⁾, ATPase 活性を阻害する。ただし, DCCD が F_0 と共有結合するのに対し²³⁾, オリゴマイシンは疎水性の相互作用をしていると考えられている (図 14)²⁴⁾。

3. ATP の基質輸送の阻害剤

ミトコンドリアでは, ATP 合成酵素の基質である ADP と P_i を内側に輸送するシステムが必要であり, それぞれアデニンスクレオチド透過担体 (ADP/ATP carrier), リン酸担体 (P_i carrier) が存在する。アデニンスクレオチド透過担体は, ミトコンドリアの内側で生じた ATP を一分子外部に放出すると同時に, ADP を一分子内部に取り込む働きをもっている。この反応は可逆的な交換反応であり, 条件によっては, 逆方向の輸送も行ないうる。一方, リン酸担体は無機リン酸 (P_i) を輸送するが, P_i が負に荷電しているため, 同時に一個の H^+ も輸送する性質をもっている。これらの透過担体を阻害することによっても, やはり ATP の合成は阻害される。

アデニンスクレオチド透過担体の阻害剤には, *Atractylis gummifera* から抽出されたアトラクチロシド誘導体 (attractyloside, carboxyatractyloside) と, *Pseudomonas cocovenenans* の産物で長鎖不飽和脂肪酸の一つ, ボングクレッキ酸 (bongkrekkic acid) がある。なかでも, カルボキシアトラクチロシドはミトコンドリアのアデニンスクレオチド担体に非常に強固に結合するため, この担体の同定, 精製に用いられる²⁵⁾。

一方, リン酸担体は各種の SH 基修飾剤 (*N*-ethylmaleimide, mersalyl など) が有効であるとされている²⁶⁻²⁸⁾。このうち, *N*-エチルマレイミドは, 膜透過性であり SH 基に共有結合し, 非可逆的であるのに対し, メルサルリルは膜不透過性で, 可逆的な結合を行なうことから, 目的に応じて使い分けられている。しかし, ともに選択性が低く, 他のタンパク質の SH 基にも作用するので, 特異性の問題が残っている。

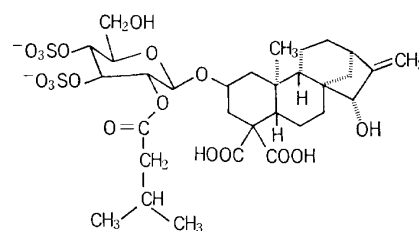
4. 脱共役剤

脱共役剤は, 呼吸基質や光エネルギーによる酸化反応のエネルギーを ATP 合成のエネルギーに転換することを妨げる作用をもつ物質の総称である。すなわち, 電子伝達反応と (ADP の) リン酸化反応との共役を脱共役させる。したがって, アンカップラー (uncoupler), 除共役剤などとも呼ばれる。他のエネルギー代謝阻害剤は特定の作用部位との結合により, その生理活性が発現されるのに反し, 脱共役剤, とくに弱酸型脱共役剤は一般に特定の作用部位を有さず, 他の阻害剤に見られない特有の物理的性質を有している。

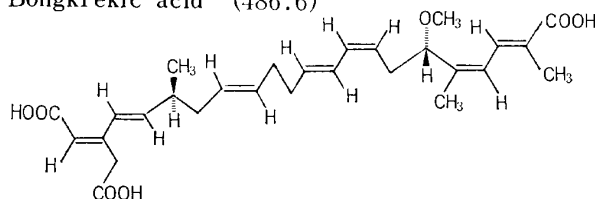
脱共役剤の主流をなすものは疎水性弱酸であり^{29,30)},

表3 エネルギー産生系の ATP の基質輸送の阻害剤

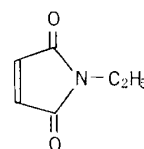
Carboxyatractyloside (768.8)



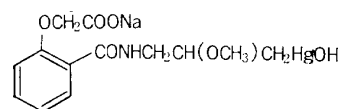
Bongkrekkic acid⁺ (486.6)



NEM (125.12) (*N*-Ethylmaleimide)



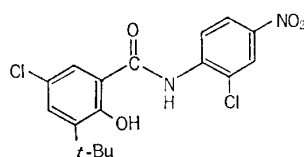
Mersalyl (505.87)



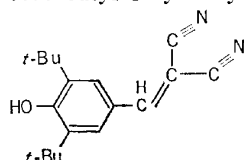
このほか, 疎水性カチオン³¹⁻³³⁾, アニオン^{34,35)}, またはペプチド³⁶⁾などにも脱共役剤としての作用を有するものがある。主たる疎水性弱酸型脱共役剤の特徴は, 表4に示すようにいずれも電子吸引性基を備えており, 分子全体の疎水性はきわめて大きい。強力な作用を示す脱共役剤の pK_a 値は7程度の値をとるものが多い。最も強力な脱共役剤は SF 6847 であり, ミトコンドリアでは 10 nM (10^{-8} M) オーダーで最大活性を示す^{29,30)}。これらの脱共役剤は H^+ 不透過性のエネルギー産生膜系に作用して, H^+ の透過性を増大させることにより, 作用が発現するものと考えられている。すなわち, ミトコンドリアを例にとると図 15A に示すように ATP 合成には電子伝達系により放出された H^+ が ATP 合成酵素中の F_0 部位を介してミトコンドリアマトリックス内に流入しなければならない。しかし, 脱共役剤により H^+ の透過経路が新たに形成されるならば, H^+ は主としてこの経路を

表4 エネルギー産生系の脱共役剤(アンカップラー)

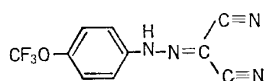
S-13⁺ (383.23)
(2',5-Dichloro-3-*tert*-butyl-4'-nitrosalicylanilide)



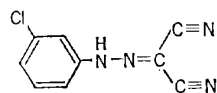
SF 6847 (282.39)
(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzylidenedimalonitrile)



FCCP (254.17)
(Carbonylcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone)



CCCP (204.62)
(Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone)



介して内部に流入することになり、ATP は合成されない。この機構は図 15B に示してあるような電流の短絡路が形成された現象に類似している。このような機構が現在最も一般的に受け入れられている脱共役剤の作用である。

それでは H^+ の透過路はどのようにして形成されるのであろうか。最も基本的な概念は図 16 に示すシャトル型の機構であり^{29,30)}、脱共役剤アニオン U^- はその強い疎水性ゆえに、膜中に存在し、これが界面で H^+ を捕捉し、それ自身は中性の分子種 UH となる。 UH は膜中を移動し、もう一方の膜界面で H^+ を放出し U^- となって、もとの膜界面へ移動するという機構である。したがって、脱共役剤はプロトン担体 (protonophore) として作用していることになる。SF 6847 の場合このサイクルは約 700 回/秒であり、ブラウン運動を基に計算された最大のサイクル数である約 1000 回/秒と、ほぼ等しい値となっている。

プロトン担体能にとって膜中で U^- が安定に存在する

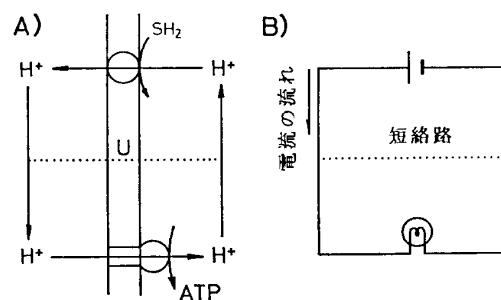


図 15 電流回路にたとえた脱共役メカニズム

A) 呼吸鎖で生じた $\Delta\mu H^+$ を利用して ATP 合成がなされるが、脱共役分子は短絡路を形成し $\Delta\mu H^+$ を打ち消す。B) 電池によって与えられた電位差を利用して電球はつくが、短絡路を形成するときにはつかない。

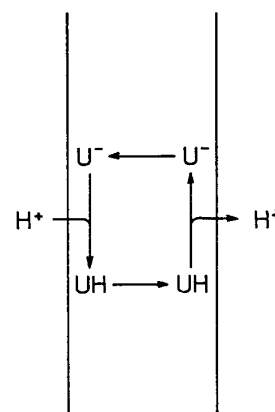


図 16 脱共役剤のプロトンフォアとしての作用

U^- は解離型、 UH は非解離型の脱共役剤分子を示す。

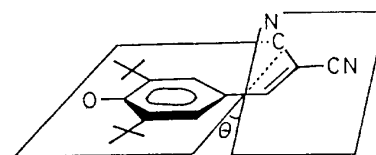
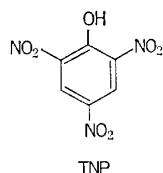
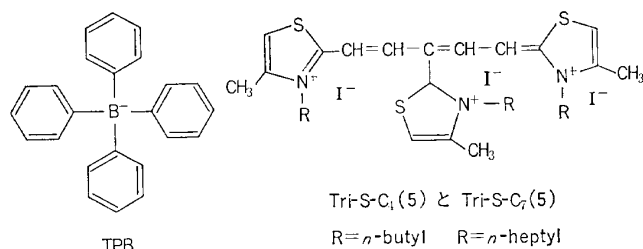


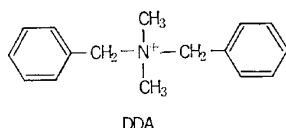
図 17 SF 6847 の分子内回転運動

ことが重要である。このためには U^- の負電荷の電荷密度が非極在化されていることが望ましい。最も強力な SF 6847 の場合、図 17 に示すようにマロンニトリル基はベンゼン環に対し直角位置から約 50 度左右に回転している。この分子内回転運動は UH で約 10^6 回/秒、 U^- で約 10^2 回/秒と U^- は UH の $1/10^4$ 程度小さい。このように、アニオン型でマロンニトリル基の分子内回転運動が低下することにより、分子全体の平面性は増大するので、マロンニトリル基の電子吸引力は増大し、負電荷は非極在化することになる³⁷⁻³⁹⁾。

疎水性弱酸以外の脱共役剤は活性濃度が μM オーダー



疎水性アニオン



疎水性カチオン

図18 脱共役作用をもっている疎水性イオン

のものが多く、弱酸性の脱共役剤に比して一般に活性は小さい。疎水性イオン型の脱共役剤は膜電位に従って電気泳動的に膜を透過し、その結果、膜電位が消失するために脱共役が発現すると考えられているが、このような解釈は必ずしも正しいとはいえないようである⁴⁰⁾。しかし、一般的にはエネルギー化されたミトコンドリアでは、膜内部が負の電荷を有しているので、疎水性カチオンが有効であるが、疎水性アニオンは何の効果も示さない。一方、クロロプラストや重ミトコンドリア粒子では内側が正の電位をもつので、疎水性アニオンが脱共役活性を示すと解釈されている。このような疎水性イオンの構造を図18に示す。

このように疎水性イオンでは、膜タンパク質の配向の違いから、アニオンとカチオンの効果が異なってくるが疎水性弱酸性型の脱共役剤も膜系により作用の程度が異なる場合がある。一般には、ミトコンドリアに対する“良好な”脱共役剤は多いが、クロロプラストなど、他の膜系では少ない。それは、脱共役剤が電子伝達系などの成分と結合して、他のタイプの阻害剤としての効果をもあわせて示すからである。たとえば、2,4-ジニトロフェノールなどのフェノール誘導体はミトコンドリアでは脱共役作用を有しているが、ハロゲン置換されたニトロフェノール類や、アルキル置換されたジニトロフェノール類がクロロプラストの電子伝達の強力な阻害剤となっている⁴¹⁾。ミトコンドリアで最も強力な SF 6847 はクロロプラストでも“良好な”脱共役剤である。

脱共役剤の作用機構は複雑で、上述のように $4pH$ や 4ψ を直接消失させるもの以外にも、ある特定の膜成分との相互作用による可能性も依然として残されているなど、多くの研究にもかかわらず、作用には不明な点が多い。

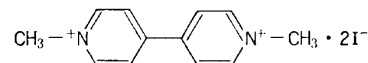


図19 パラコート

1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride

選 択 毒 性

前述のような、エネルギー産生系の阻害剤を農薬として用いる場合、問題となるのが選択毒性である。選択毒性とは、“互いに接近している二種の生物のうち、一方には害を与えないで、他方には損傷を与えること”と定義される⁴²⁾。たとえば、近年、服毒自殺が後を絶たないことで話題となっている除草剤、パラコート(図19)は、植物ではクロロフィルにおける電子伝達の過程で生じた励起電子により一電子還元を受け、これがもとのジピリジルイオンにもどる際に放出される過酸化水素 (H_2O_2) によって殺草作用を示す。ところが、パラコートはミトコンドリアにも作用するので、人体にも有害である。

このように、エネルギー産生系の阻害剤の選択性は大きくない。しかし、次のように選択性のみられる場合もある。先に、電子伝達系の阻害剤として紹介したロテノン⁴³⁾は、ほ乳類に対しては、なんら毒性を示さないが、魚類はロテノンに対して、きわめて敏感である。これは、ロテノンが、ほ乳類体内で急速に酸化され、解毒されるためである。それゆえに、ほ乳類の細胞から単離されたミトコンドリアでは強い電子伝達阻害が観察される。また、ある種の細菌や原生動物はアンチマイシン A や CN^- 存在下でも、突然変異によらず生育することができ⁴³⁾、電子伝達系が存在しないことを示している。また、脱共役剤についても種差が反映されることが観察されている。たとえば、ミトコンドリアとクロロプラストでは単位タンパク質量当りの電子伝達や ATP 合成阻害に必要なとされる脱共役剤濃度がミトコンドリアよりも二桁程度大きい^{29,30)}。また、肝臓ミトコンドリアよりも脂質含量の大きいとされている心筋ミトコンドリアでは、脱共役剤の作用がより効果的であるということ⁴⁴⁾も報告されている。これらの事実は薬物の選択性を考える上で、オルガネラ間、あるいは膜の両サイドでの、リン脂質構成成分の違いや、それに伴う膜タンパク質の配向、配置の差異を考慮しなければならないことを示している。

お わ り に

以上、生物のエネルギー獲得の営みと、獲得されたエネルギーの ATP という化学エネルギーへの転換、さら

に、このエネルギーを利用した、生命維持の活動と、それぞれの反応の阻害剤について、解説を試みた。

現在、それぞれの反応を構築する構成成分のより詳細な研究、あるいは反応機構、さらには各阻害剤の作用メカニズムの研究が盛大に行なわれている。これらの研究は、より安全性が高く、より活性の強い農薬開発にも大きく貢献するものと期待される。

引用文献

- 1) P. Mitchell: *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 399 (1976)
- 2) P. Mitchell: *Eur. J. Biochem.* **95**, 1 (1979)
- 3) H. Rottenberg: *Method. Enzymol.* **55**, 547 (1979)
- 4) *Method. Enzymol.* **69** (1980) に詳しい。
- 5) 徳永史生: 蛋白質 核酸 酵素 **27**, 1126 (1982)
- 6) Y. A. Ovchinnikov: *FEBS Lett.* **148**, 179 (1982)
- 7) たとえば, C. R. Hackenbrock & K. M. Hammon: *J. Biol. Chem.* **23**, 9185 (1975)
- 8) M. Futai & H. Kanazawa: *Microbiol. Rev.* **47**, 285 (1983)
- 9) Y. Kagawa: *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 45 (1978)
- 10) 曾根 史: 蛋白質 核酸 酵素 **27**, 1110 (1982)
- 11) G. E. Shull, A. Schwartz & J. B. Lingrel: *Nature* **316**, 691 (1985)
- 12) K. Kawakami, S. Noguchi, M. Noda, H. Takahashi, T. Ohta, M. Kawamura, H. Nojima, K. Nagano, T. Hirose, S. Inayama, H. Hayashida, T. Miyata & S. Numa: *Nature* **316**, 733 (1985)
- 13) D. H. MacLennan, C. J. Brandl, B. Korczak & N. M. Green: *Nature* **316**, 696 (1985)
- 14) R. K. Crane: *Fed. Proc.* **24**, 1000 (1965)
- 15) P. A. Dibrov, V. A. Kostyrko, R. K. Lazarova, V. P. Skulachev & I. A. Smirnova: *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 449 (1986)
- 16) たとえば, R. L. Post, C. R. Merritt, C. R. Kinsolving & C. D. Albright: *J. Biol. Chem.* **235**, 1796 (1960)
- 17) K. Nagai: *J. Chem. Soc. Jpn. Pure Chem. Sec.* **23**, 744 (1902)
- 18) S. Takei, S. Miyajima & M. Ono: *Berichte* **61**, 1041 (1932)
- 19) Y. Hatefi, A. G. Haavik & D. E. Griffiths: *J. Biol. Chem.* **237**, 1681 (1962)
- 20) S. H. K. Ho, U. D. Gupta & J. S. Rieske: *J. Bioenerg. Biomemb.* **17**, 269 (1986)
- 21) H. Lardy, P. Reed & C. C. Lin: *Fed. Proc.* **34**, 1707 (1975)
- 22) H. S. Penefsky: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1589 (1984)
- 23) A. Azzi, R. P. Casey & M. J. Nalecz: *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 209 (1984)
- 24) S. Papa, F. Guerrieri, F. Zanotti & R. Scarfo: "H⁺-ATPase (ATP synthase): Structure, Function, Biogenesis, The F₀F₁ Complex of Coupling Membranes," ed. by S. Papa, K. Altendorf, L. Ernster & L. Packer, Adriatica Editrice, Bari, 1984
- 25) たとえば, M. Klingenberg, H. Aquila & P. Riccio: *Method. Enzymol.* **56**, 407 (1979)
- 26) A. Fonyo: *J. Bioenerg. Biomemb.* **10**, 171 (1978)
- 27) A. Fonyo & P. V. Vignais: *J. Bioenerg. Biomemb.* **12**, 137 (1980)
- 28) J. P. Wehrle & P. L. Pedersen: *J. Bioenerg. Biomemb.* **13**, 285 (1981)
- 29) H. Terada: *Biochim. Biophys. Acta* **639**, 225 (1981)
- 30) 寺田 弘: 生化学 **51**, 211 (1979)
- 31) N. Takeguchi, T. Saitoh, M. Morii, K. Yoshikawa & H. Terada: *J. Biol. Chem.* **260**, 9158 (1985)
- 32) V. P. Skulachev, A. A. Jasaitis, V. V. Navickaite, L. S. Yaguzhinsky, E. A. Liberman, V. P. Topali & L. M. Zofina: *FEBS Symp.* **17**, 275 (1969)
- 33) L. E. Bakeeva, L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, V. V. Kuliene, D. O. Levisky, E. A. Liberman, I. I. Severina & V. P. Skulachev: *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 13 (1970)
- 34) L. L. Grinius, A. A. Jasaitis, Yu. P. Kadziauskas, E. A. Liberman, V. P. Skulachev, V. P. Topali, L. M. Tsofina & M. A. Vlandimirova: *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 1 (1970)
- 35) P. I. Isaev, E. A. Liberman, V. D. Samuilov, V. P. Skulachev & L. M. Tsofina: *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 22 (1970)
- 36) Y. Takaishi, H. Terada & T. Fujita: *Experientia* **36**, 550 (1980)
- 37) K. Yoshikawa, N. Kumazawa, H. Terada & M. Ju-ichi: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 1108 (1981)
- 38) K. Yoshikawa & H. Terada: *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7644 (1982)
- 39) H. Terada, N. Kumazawa, M. Ju-ichi & K. Yoshikawa: *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 192 (1984)
- 40) H. Terada, H. Nagamune, N. Morikawa & M. Ikumo: *Biochim. Biophys. Acta* **807**, 168 (1985)
- 41) たとえば, J. J. S. van Rensen, D. Wong & Govindjee: *Z. Naturforsch. Teil C* **34**, 413 (1978)
- 42) A. Albert: "Selective Toxicity," Chapman and Hall, London, 1973
- 43) たとえば, Y. Koaze, H. Sakaki, H. Yonehara & H. Umezawa: *J. Antibiot.* **9**, 89 (1956)
- 44) H. Terada, S. Muraoka & T. Fujita: *J. Med. Chem.* **17**, 330 (1974)