|||||| 資 料 |||||

おからより抽出したリン脂質の生化学実験素材 としての有用性の検討

下 岡 尚^{*1}, 小 林 聡 子^{*1}, 篠 原 康 雄^{*1},
堀 均^{*2}, 寺 田 弘^{*1}

^{*1}徳島大学薬学部, ^{*2}徳島大学工学部

Usefulness of the Phospholipid Extracted from *Okara* as an Experimental Material of Biochemistry

Takashi Shimooka^{*1}, Satoko Kobayashi^{*1}, Yasuo Shinohara^{*1}, Hitoshi Hori^{*2} and Hiroshi Terada^{*1}

^{*1}Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima ;

^{*2}Faculty of Engineering, University of Tokushima

緒 言

おから（雪花菜）は、豆腐の製造工程で得られる熱水に不溶性の成分であり、大豆固形成分のおよそ23%がおからとして残存する¹⁾。水分を多量に含むため、豆腐を製造する際に、大豆1kgにつき1.4kgのおからが生産されるという。従って、大規模の豆腐工場では、1日当たり数トンのおからが生産される。このうちごく一部は、そう菜用材料として、あるいは家畜の飼料として用いられているが、水分を多く含んでおり、非常に腐敗しやすいので、大部分は産業廃棄物として処理されているのが現状である。しかし、おからは、水質・土壌汚濁等の環境汚染の原因となること、また、資源の有効利用という点で、おからの新しい利用法が社会的に要求されてきている。

今回、我々は、おからの新しい有効利用法の開発を目的とし、おからに含まれる有用な生理活性物質の探索を試みた。おからの成分は、その原料である大豆に準ずることが報告されている²⁾。大豆から得られる有用な生理活性物質の1つにリン脂質が挙げられる。大豆リン脂質は、生化学基礎実験において有用であり、多くの実験に用いられている³⁻⁵⁾。また、リン脂質、とりわけホスファチジルコリン（レシチン）は、機能性食品として一般に知られており、その商品価値は極めて高い。そこで我々は、おからに含まれるリン脂質に注目し、おから由来リン脂質の抽出法の確立、構成リン脂質の分析、及びおから由来リン脂質の生化学基礎実験における有用性について検討した。

実 験 方 法

1. おからのリン脂質の抽出

おからの脂質の抽出は、基本的にFolch法⁶⁾を以下に述べる要領で改変して行った。

豆腐工場から提供された新鮮な含水おから500gを、250gずつ1,000mlの三角フラスコに分取し、各々にクロロホルム：メタノール（2：1）混液を350ml加え、3時間放置した。この後、抽出液をガーゼでろ過し、残留物に再びクロロホルム：メタノール（2：1）混液を350ml加えた。この操作を3回繰り返し、約1,500mlの抽出液を得た。これをロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液に無水硫酸ナトリウム5gを加えて脱水した。この濃縮液にクロロホルム10mlを加えた後、ろ過し、ろ液を更に濃縮し、ゼリー状の脂質11.2gを得た。

得られた脂質を、向流分配法⁷⁾により、単純脂質と極性脂質^{*1)}に分配した。向流分配法は、下記の手順で行った⁸⁾。

200mlの分液漏斗2個（以下、分液漏斗1，2）を用いて分配操作を行った。溶媒として、300mlの石油エーテル（bp30～60℃）と300mlのエタノール：水（87：13）混液を、1,000mlの分液漏斗中で混合し、分配したものを用いた。分配した溶媒の平衡上層をA液、平衡下層をB液とし、全脂質（11.2g）をA液45mlに溶解し、分液漏斗1に入れた。これにB液15mlを加え、振とうした。この下層B液を新たなA液45mlの入っている分液漏斗2に移し、分液漏斗1には新たなB液15mlを入れ、分液漏斗1及び2を振とうした。分液漏斗2の下層B液をフラスコに分取し、分液漏斗1の下層B液は分液漏斗2に移した。分液漏斗1に新たなB液15mlを入れ、同様の操作を6回繰り返した。この要領で得られた各B層を合わせ（15ml×8）、ベンゼン5mlとともにロータリーエバポレーターで濃縮し、複合脂質1.0gを得た。

複合脂質からのリン脂質の分画は、アセトン分画法⁹⁾により以下の要領で行った。

複合脂質1.0gをアセトン30mlに懸濁し、この懸濁液を遠沈管に移し、KUBOTA KS-5000P型卓上遠心機で遠心（2,000rpm×5min）することにより沈澱を回収した。沈澱を再びアセトン30mlに懸濁し、遠心分離し、更に20mlのアセトンを加えて沸騰させ、単純脂肪を抽出した（2回）。沈澱を20mlのクロロホルムに溶かし、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、0.4gのリン脂質を得た。

得られたリン脂質は5mlのクロロホルムに溶解し、アルゴンにより置換し、遮光した後、-20℃で保存した。

2. リン脂質の分析

リン脂質の分析は、薄層クロマトグラフィー（TLC）により行った。展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水（65：25：4）混液を用い、呈色は硫酸セリウム試薬により行った。リン脂質の同定は、市販のリン脂質標品とのR_f値の比較により行い、また、各リン脂質の重量%は、島津CS-910型クロマトスキャナーを用いて算出した。

リン脂質のリン濃度は、Amesの方法¹⁰⁾により、島津UV-1200型分光光度計を用いて比色定量した。

リン脂質中の過酸化脂質^{*2)}は、チオバルビツール酸（TBA）法¹¹⁾により生成したマロンジアルデヒド（MDA）とTBAの反応により生成した赤色化合物を、島津UV-160型分光光度計にて532nmの吸光度を測定することにより定量し、これをTBA反応陽性物質（TBARS）量とし、過酸化脂質量の指標とした。

リン脂質の脂肪酸組成は、Morrisonの方法¹²⁾に準じ、島津GC-6A型ガスクロマトグラフィーにより分析した。

3. リポソームの調製

リポソームは、水相に10mM Tris-HCl緩衝液（pH7.3）を用い、逆相蒸発法^{13,14)}により、大きな1枚膜リポソーム（LUV）として調製した。得られたリポソーム懸濁液を0.4μm、0.2μmのポリカーボネートフィルター（Nuclepore）でそれぞれ1回ずつ限外ろ過し、サイズをそろえた。リポソームのリン濃度は、Amesの方

*1 単純脂質，極性脂質：脂質は単純脂質と極性脂質とに大別される。単純脂質が脂肪酸やアルコールなど炭素（C）、水素（H）、酸素（O）より成り、水には溶けにくい性質を示すのに対し、極性脂質はリン（P）や窒素（N）を含み、両親媒（水にも油にも溶ける）の性質を示す。

*2 過酸化脂質：天然に存在する脂質は脂肪酸部分に不飽和結合を含むことが多い。この不飽和結合部位は、酸素によって攻撃されやすく、長時間空気（酸素）に接触させると過酸化を受け、分子内にペルオキシ構造（-O-O-）を有する過酸化脂質を生ずる。従って、過酸化脂質量は、しばしば、脂質の劣化の指標として用いられる。

法¹⁰⁾により測定した。

4. リボソームの浸透圧応答の測定

リボソームの浸透圧応答は、高濃度のグルコース溶液を添加した時のリボソームの収縮に基づく濁度変化を測定することにより求めた¹⁵⁾。30℃に保温した0.5mMリボソーム懸濁液2.94mlに、種々の濃度のグルコース溶液を60 μ l添加し、450nmにおける濁度変化を島津UV-3000型分光光度計にて測定した。

5. リボソーム膜の流動性の測定

リボソーム膜の流動性は、蛍光プローブである1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン (DPH^{*3}, Sigma社)の蛍光偏光度を測定することにより求めた。0.5mMのリボソーム懸濁液3 mlに、1.5mMのDPH (テトラヒドロフラン溶液)を1 μ l (最終濃度0.5 μ M)添加し、室温で1時間インキュベーションした。励起波長 366nm, 蛍光波長 430nmにおける蛍光強度を、偏光フィルターを用いて日立650-60型蛍光光度計にて測定し、次式に従って蛍光偏光度を算出した¹⁶⁾。

$$\text{蛍光偏光度 (P)} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}G}{I_{\parallel} + I_{\perp}G}$$

ただし、 $I_{\parallel}$ は水平成分の蛍光強度、 $I_{\perp}$ は鉛直成分の蛍光強度、 G は補正係数である。

6. ADP/ATP透過担体の再構成

おから由来リン脂質を用いて、ミトコンドリア内膜たん白質であるADP/ATP透過担体 (AAC) の再構成を、Kramerの再構成系¹⁷⁾に準じて、以下に述べる要領で行った。

Smithの方法¹⁸⁾により単離したウシ心筋ミトコンドリア (BHM) からAACを単離し、これをおから由来リン脂質からなる小さな1枚膜リボソーム¹⁹⁾ (SUV) に、凍結融解法²⁰⁾により再構成した。再構成されたAACの活性は、³H標識されたADPを添加し、リボソーム内に取り込まれたADP量を、Aloka LSC-700型液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定することにより求めた。

再構成したリボソームに含まれるたん白質の定量はBCA法²¹⁾により行った。

結 果

1. おから由来リン脂質の収率及び分析結果

実験方法でも述べたが、最終的なリン脂質の収量は生のおから (含水おから) 500gにつき0.4g (収率0.08%)であった。なお、ここでは何回か行った実験結果の一例を示したが、他の実験結果においてもほぼ同様の収率が得られ、再現性は高かった。また、この収率は、おからを一度凍結乾燥してからリン脂質を抽出した場合の収率 (乾燥おからからの収率は0.40%)と全く同一であった。

TLCによりおから由来リン脂質の分析を行った結果、構成リン脂質成分として、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS)、カルジオリピン (CL)、ホスファチジルグリセロール (PG) が含まれていることが明らかとなった。更に、クロマトスキャナーを用いて、各リン脂質成分の含有量を測定したところ、表1に示したように、大豆より精製されたリン脂質、あるいは実

^{*3} DPH : 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene. 膜の“かたさ”, “やわらかさ”の指標である流動性を測定する際に用いられる蛍光プローブで、右に示す構造の化合物。

表 1 おからより抽出したリン脂質の構成成分

リン脂質	本標品 (%)	大豆由来標品	
		黒田ら ²²⁾ (%)	Casey ら ²³⁾ (mol%)
ホスファチジルコリン	22.8	33.0	22.0
ホスファチジルエタノールアミン	22.6	12.2	40.0
ホスファチジルセリン	19.5	34.2 ^a	20.0
ホスファチジルグリセロール	11.2		
ホスファチジン酸			5.0
カルジオリピン	12.9		
リゾリン脂質	n.d. ^b	16.6	11.0

注) おからより抽出したリン脂質を薄層クロマトグラフィーにより分離分析した結果を%表示した。比較の目的で、大豆から精製されたリン脂質組成²²⁾及び生化学基礎実験に実際に用いられている粗精製大豆抽出リン脂質の組成²³⁾を合わせて表示した。

^a ホスファチジルイノシトールを含む値。

^b 分析していない。

表 2 おからより抽出したリン脂質の脂肪酸成分 (%)

脂肪酸	本標品	大豆由来標品	
		黒田ら ²²⁾	Kagawa ら ²⁴⁾
パルミチン酸 (16:0)	25.8	23.1	20.1
ステアリン酸 (18:0)	3.6	n.d. ^a	4.9
オレイン酸 (18:1)	8.9	7.6	6.4
リノール酸 (18:2)	54.6	58.5	59.0
リノレン酸 (18:3)	9.1	7.3	9.0

注) おからより抽出したリン脂質の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。表1同様、大豆から精製されたリン脂質の脂肪酸組成²²⁾及び生化学基礎実験に実際に用いられている粗精製大豆抽出リン脂質の脂肪酸組成²⁴⁾を合わせて表示した。

^a 検出されていない。

際に生化学基礎実験に用いられている粗精製大豆抽出リン脂質とよく似た組成であることが明らかになった。また、リン脂質の脂肪酸組成は、表2に示すように、パルミチン酸 (C_{16:0})、リノール酸 (C_{18:2}) がそのほとんどを占め、この結果もやはり、大豆より精製されたリン脂質、生化学基礎実験に用いられている粗精製大豆抽出リン脂質とほぼ同様であった。

また、本法によって精製されたおから由来リン脂質中に含まれるTBARS量をTBA法により測定した結果、80nmolのリン脂質中には、TBARSは全く検出されなかった。一般に脂質が劣化すると、過酸化脂質の含量が増大することが知られている。従って、この結果から、本法によって精製されたリン脂質は、その抽出、精製の過程において劣化をほとんど受けていなく、かつ、本法はおから由来のリン脂質の抽出、精製法として、適切な方法であるものと結論された。

2. リボソームの浸透圧応答

リン脂質二分子膜からなるリボソームは閉鎖小胞であるので、外液に膜を透過しない物質（グルコース）を加えることにより外液の浸透圧を高めると、脂質膜は等張性を保とうとし、水をリボソーム内から外へ排出す

る。その結果、リポソームは収縮し、粒径が小さくなる。リポソームの粒径が減少すると450nmにおける吸光度は増加し、濁度は増大する。図1は、グルコースの最終濃度が30mMになるように添加した時の、リポソームの濁度の経時変化を示したものである。この濃度のグルコースの添加によって、直ちに吸光度の増大が観察され、調製されたリポソームが浸透圧に良好に応答して収縮することが確認された。

リポソームが完全に浸透圧に応答して膨潤、収縮している場合、添加したグルコースの濃度の逆数 ($1/[\text{グルコース}]$) と450nmにおける濁度変化の逆数 ($1/\Delta A$) は、直線関係を示すことが知られている²⁵⁾。図2は、両者の関係をプロットしたグラフである。グラフからも明かなように、両者に直線関係が認められる。この結果は、リポソームが完全に浸透圧に応答していることを示しており、おから由来リン脂質は、安定なリン脂質二分子膜を形成することが明らかとなった。

3. リポソーム膜流動性の温度依存性

生体膜は、SingerとNicolsonによって提唱された流動モザイクモデル²⁶⁾からも分かるように、脂質二分子膜を基本構造とし、適度な流動性をもっていると考えられている。おから由来リン脂質より形成されたリポソーム膜の流動性を、蛍光プローブDPHの蛍光偏光度を測定することにより検討した。図3は、おから由来リン脂質からなるリポソーム膜における蛍光プローブDPHの蛍光偏光度の温度依存性を測定した結果である。温度が上昇するに従い、蛍光偏光度は直線的に減少している。蛍光偏光度の減少は、膜の流動性の増大を示しており、流動性は温度が上昇するに従い増大する。また、このような直線的な流動性の増大は、複数のリン脂質から構成され、かつ、その脂肪酸側鎖に不飽和脂肪酸を含有する膜にみられる特有の現象であり、一般に生体膜は同様の挙動を示す²⁷⁾。この結果より、おから由来リン脂質二分子膜は、生体膜の流動性と同様の挙動を示すことが明らかとなった。

4. 再構成リポソームの活性測定

膜たん白質の機能解析のために、目的とするたん白質を精製し、これをリポソームに再構成する手法がよく用いられている²⁸⁻³⁰⁾。この際、リポソームを構成するリン脂質組成の違いにより、たん白質の活性が大きく影響される³¹⁾。今回、おから由来リン脂質を用いて調製されたリポソーム (SUV) にADP/ATP透過担体 (AAC) を再構成し、その活性を測定することにより、おから由来リン脂質の再構成系における有用性を検討

図1 おから由来リン脂質で調製したリポソームの浸透圧応答
注) グルコースを添加する前後での、450nmにおける吸光度の経時変化を測定し、浸透圧の変化に応じたりポソームの体積変化を解析した。ここでは最終濃度が30mMとなるようにグルコースを添加した場合の吸光度の経時変化を示した。

図2 リポソームの浸透圧応答のグルコース濃度依存性
注) 添加したグルコース濃度の逆数と濁度変化の逆数に良好な直線関係が認められ、調製されたリポソームが、浸透圧に良好に応答し得ることが明らかになった。

した。表 3 は、AACのADPの取り込み活性を測定した結果である。AACは、ミトコンドリア内膜においてアデニンヌクレオチドの交換担体として機能しており³²⁾、その特異的阻害剤としてカルボキシアトラクチロシド (CATR) が知られている³²⁾。AACを再構成したリポソームにおいて、ADPの取り込みの特異活性 (たん白質 1 mg当たり13.5nmol) が、CATRによって1割程度 (1.6nmol/mg) にまで阻害された結果は、リポソーム内へのADPの取り込みがAACを介してなされていることを示している。この結果から、AACは活性を保持したまま、おから由来リン脂質二分子膜に再構成されていることが明らかとなった。

考 察

以上述べたように、我々は、水を含んだ状態のおからより、乾燥することなく、簡便でかつ収率のよいリン脂質の抽出法を確立した。乾燥の際にかかる時間及び費用の面から考えると、このように水を含んだ状態でおからを処理できることは、おからの有効利用のため、極めて有効な手法であると考えられる。また得られたリン脂質が、過酸化を受けることなく抽出されていることより、おから由来リン脂質の機能性食品としての利用が可能であることが示唆された。更に、得られたリン脂質の組成及び脂肪酸組成を調べた結果、おからの原料である大豆リン脂質と同様の成分であることが明らかとなった。この結果は、生化学基礎実験に用いられている粗精製大豆抽出リン脂質 (アゾレクテン) の用途に、おから由来リン脂質が適用できることを強く示唆しており、以下、生化学基礎実験におけるおから由来リン脂質の有用性について考察を行った。

リン脂質は、生体膜の主要構成成分であり、二分子膜として存在している³³⁾。リン脂質二分子膜は、区画性を維持するための障壁として、また、適度な流動性を有することにより、膜たん白質の支持体として重要な役割を演じている³³⁾。おから由来リン脂質二分子膜のこのような性質を、リポソームを調製し、その膜物性を測定することにより検討した。その結果、浸透圧応答の測定より、おから由来リン脂質二分子膜は安定なリン脂質二分子膜を形成していること、また、蛍光偏光度の測定より、生体膜に似た適度な流動性を示すことが明らかとなった。更に、リン脂質は、膜たん白質の活性発現に深く関与していることが知られているが、再構成リポソームを調製し、たん白質の活性を測定した結果、膜たん白質 (AAC) が活性を保持した状態で、おから由来リン脂質二分子膜に再構成されていることが明らかとなった。以上3つの結果は、おから由来リン脂質の生化学基礎実験における有用性を強く支持するものである。

図3 おから由来リン脂質で調製したリポソーム膜における蛍光プローブDPHの蛍光偏光度の温度依存性

表 3 おから由来リン脂質を用いたミトコンドリア膜たん白質 AAC の再構成

阻害剤	ADP 取り込み活性 (nmol・mg ⁻¹ ・min ⁻¹)
none	13.5±0.1
100 μM CATR	1.6±0.5

注) ADP 取り込み活性が、AAC の特異的阻害剤 CATR によってほとんど完全に阻害されたことから、この活性が AAC によるものであることが明らかになった。更に、ここではデータは示さないが、用いたリポソーム画分には高度に精製された AAC が含まれていることを SDS-PAGE によって確認した。

以上述べたように、その大部分が産業廃棄物として処理されているおからより、付加価値の高い有用な生理活性物質が得られたという本実験結果は、資源の有効利用という点で非常に興味深いものと思われる。今後、レクチンや糖脂質などの生理活性物質源としても解析を進める予定である。

要 約

おからは、多くの有用成分を含有するにもかかわらず、一部がそう菜または家畜の飼料として用いられているほかは、産業廃棄物として処理されている。我々は、おからの有効な利用方法を開発すべく、おからからの有用な生理活性物質の精製を目的とした研究を開始した。今回、おからに含まれるリン脂質に注目し、その抽出法の確立、分析、及び生化学基礎実験における有用性について検討した。その結果、おからを乾燥させることなく、簡便でかつ収率のよい抽出法を確立した。また、リン脂質の分析結果より、おから由来リン脂質は、原料である大豆リン脂質と同様であることが明らかとなった。更に、おから由来リン脂質を用いて脂質液胞であるリボソームを調製し、膜物性の検討、及び膜たん白質の再構成を試みた結果、おから由来リン脂質は安定な二分子膜を形成し得ること、また、このようにして調製された二分子膜は膜たん白質の再構成にも用いることが可能であることが明らかになった。以上の結果は、生化学基礎実験におけるおから由来リン脂質の有用性を強く支持するものであり、おからの新しい有効利用の1つとして重要な知見を与えると考えられる。

*

本研究は、さとの雪(株)による研究助成により行われました。ご協力いただきました関係者の方々に、深く感謝の意を表します。

また、AACの再構成実験を行うに際し、有用な御助言をいただきました帝京大学医学部 笠原道弘教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 渡辺篤二, 斎尾恭子, 橋詰和宗: 大豆とその加工 I, p.170 (1987) 建帛社, 東京
- 2) 杉田浩一, 堤 忠一, 森 雅央編: 新編日本食品事典, p.150 (1982) 医歯薬出版, 東京
- 3) Yoshikawa, K., Hayashi, H., Shimooka, T., Terada, H. and Ishii, T.: Stable phospholipid membrane supported on porous filter paper, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **145**, 1092~1097 (1987)
- 4) Terada, H., Nagamune, H., Osaki, Y. and Yoshikawa, K.: Specific requirement for inorganic phosphate for induction of bilayer membrane conductance by the cationic uncoupler carbocyanine dye, *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 488~490 (1981)
- 5) Kashahara, M. and Hinkle, P. C.: Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7384~7390 (1977)
- 6) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. A.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497~509 (1957)
- 7) Galanos, D. S. and Kapoulas, V. S.: Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures, *J. Lipid Res.*, **3**, 134~136 (1962)
- 8) 藤野安彦: 生物化学実験法 9 脂質分析法入門, pp.64~65 (1978) 学会出版センター, 東京
- 9) 藤野安彦: 生物化学実験法 9 脂質分析法入門, p.62 (1978) 学会出版センター, 東京
- 10) Ames, B. N.: Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases, *Methods Enzymol.*, **8**, 115~118 (1966)
- 11) Ohkawa, H., Ohnishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid

- reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351~358 (1979)
- 12) Morrison, W. R. and Smith, L. M. : Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J. Lipid Res.*, **5**, 600~608 (1964)
 - 13) Szoka, F. Jr. and Papahadjopoulos, D. : Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reversephase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4194~4198 (1978)
 - 14) Szoka, F. Jr., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E. and Papahadjopoulos, D. : Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **601**, 559~571 (1980)
 - 15) Blok, M. C., van Deenen, L. L. M. and Gier, J. D. E. : Effect of the gel to liquid crystalline phase transition on the osmotic behaviour of phosphatidylcholine liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 1~12 (1976)
 - 16) Zolese, G., Annarina, A., Bertoli, E., Curatola, G. and Tanfani, F. : Interaction of the herbicide atrazine with model membranes, *Chem. Phys. Lipids*, **56**, 101~108 (1990)
 - 17) Kramer, R. : Reconstitution of ADP/ATP translocase in phospholipid vesicles, *Methods Enzymol.*, **125**, 610~618 (1986)
 - 18) Smith, A. L. : Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria, *Methods Enzymol.*, **10**, 81~86 (1967)
 - 19) 菊池 寛, 井上圭三 : リボソーム I, *細胞工学*, **2**, 1136~1150 (1983)
 - 20) 笠原道弘 : 続生化学実験講座 3 膜脂質と血漿リポタンパク質, pp.517~528 (1986) 東京化学同人, 東京
 - 21) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. : Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76~85 (1985)
 - 22) 黒田圭一, 小島義樹, 西出英一, 山口迪夫 : 脂肪酸組成の異なる 3 種のリン脂質及びその関連油脂のラット血清コレステロール上昇抑制効果の比較, *栄養学雑誌*, **48**, 213~220 (1990)
 - 23) Casey, R. P., Ariano, B. H. and Azzi, A. E. : Studies on the transmembrane orientation of cytochrome c oxidase in phospholipid vesicles, *Eur. J. Biochem.*, **122**, 313~318 (1982)
 - 24) Kagawa, Y., Kandrach, A. and Racker, E. : Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **248**, 676~684 (1973)
 - 25) Bittman, R. and Blau, L. : The phospholipid-cholesterol interaction, *Biochemistry*, **11**, 4831~4839 (1972)
 - 26) Singer, S. J. and Nicolson, G. L. : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**, 720~731 (1972)
 - 27) Antunes-Madeira, M. C. and Madeira, V. M. C. : Membrane fluidity as affected by the organocholine insecticide DDT, *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**, 469~474 (1990)
 - 28) Kagawa, Y. : Reconstitution of oxidative phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 297~338 (1972)
 - 29) Hokin, L. E. : Reconstitution of carriers in artificial membranes, *J. Membr. Biol.*, **60**, 77~93 (1981)
 - 30) 小池晴彦, 寺田 弘 : タンパク質核酸の分離精製法, 廣川書店, 印刷中
 - 31) Kundig, W. and Roseman, S. : Sugar transport, *J. Biol. Chem.*, **246**, 1407~1418 (1971)
 - 32) 寺田 弘, 篠原康雄 : 農薬のターゲットとしてのエネルギー獲得系, *日本農薬学会誌*, **11**, 641~651 (1986)
 - 33) 藤井達三, 寺田 弘, 野村靖幸 : 薬物作用と生体膜, pp.1~47 (1987) 南江堂, 東京

(受付:平成 3 年 6 月17日)