リポソームにおける荷電物質の 透過機構とその速度解析

松 岡 浩

東京大学工学部化学工学科 〒113 文京区本郷 7-3-1

Mechanism and Rate Studies on Permeation of Charged Materials through Liposome Membranes

Hiroshi MATSUOKA

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Tokyo,
Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113

There are two kinds of permeation mechanisms through liposome membrane discriminated by the difference of permeation molecules. One is the permeation mechanism concerning the molecular sieving of ions or polar molecules such as K^+ , Na^+ , glucose etc. According to this mechanism, the molecules permeate through the boundary domains between the microclusters composed of molecules either in gel state or in liquid-crystalline state. The other permeation is for water and proton. Proton permeation mechanism is regarded as proton transfer along a network of hydrogen bonded water molecules in the hydrophobic media of phospholipids. In this article, recent progress in the research on the mechanism are briefly reviewed together with rate studies on permeation of charged materials and related topics.

Key words : Liposome, Ion permeation, Proton permeation, Electron potential difference, Phase transition temperature

はじめに

- 1 荷電物質の膜透過理論
- 2 イオン類の膜透過
- 3 プロトンの膜透過
- 4 膜電位差の効果
- 5 リポソームの構造による物質透過速度の違い
おわりに

が、純粋にリン脂質二重層膜での物質透過過程を観察するには再構成系での実験は特に重要である。近年、リポソームを用いての物質輸送研究がかなり行われ、その物質透過のメカニズムも徐々に分かってきた。その結果、リン脂質の相転移温度近傍での挙動によって透過物質は2群に分けられることがわかってきた。すなわち、イオンや分極性の物質のグループと、プロトンや水などのグループである。

また、応用面で考えるならば、リポソームを生体内での薬剤輸送の手段として用いようとする試みが行われている¹⁾。そのための成書も出版されている²⁾。疎水性の薬剤はリポソームのアシル基部分に存在し、親水性の薬剤はリポソーム内水相に存在することが知られている (Fig. 1)。リポソーム内水相に存在する親水性の薬剤の

はじめに

生体膜系における物質輸送研究は生体膜機能そのものの興味からも、応用面としての薬剤放出制御の面からも興味を持たれている研究である。

生体膜における物質透過の研究には多くの方法がある

放出制御のための基礎研究として, リポソーム膜における物質透過の研究は重要である。

本綜説ではリポソーム系での物質の膜透過, 特に荷電物質の膜透過に焦点をあてて, 上述した2群の物質の膜透過の違いを解説し, さらに荷電物質の膜透過に影響を及ぼす二, 三の要因についてまとめた。

1. 荷電物質の膜透過理論

各論に入る前に, リポソーム系における荷電物質の膜

Fig. 1 リポソームの模式図

親水性および疎水性の両物質が保持されている。

透過理論について復習する。一般的には膜系における荷電物質の輸送の駆動力 $\Delta\mu$ は膜を介しての濃度差と電位差との項からなり, 常温では次のように書ける。

$$\Delta\mu [\text{mV}] = 59.1 \Delta \log (C^i/C^o) + \Delta\phi \quad (1)$$

実際の実験系の場合, この両者の効果を同時に評価することは困難なので, 電位差($\Delta\phi$)が無視できる場合のイオンの膜透過について検討を行っている場合が多い。

さらに, リポソーム外水相を対照とするイオン濃度がゼロになる条件でイオンの輸送速度を調べている。つまり,

j 成分のイオンフラックス $J_j [\text{mol}/\text{m}^2\text{s}]$ は,

$$J_j = -V^i/S \cdot (dC_j^i/dt) = -P_j \cdot C_j^i \quad (2)$$

ここで, P_j は j 成分の膜透過係数 $[\text{m}/\text{s}]$, V^i はリポソーム内水相体積 $[\text{m}^3]$ そして, S はリポソームの界面積 $[\text{m}^2]$ である。すなわち, 平面膜系である黒膜系での実験と異なってリポソーム系での実験の場合, P_j を求めるには V^i/S を求める必要がある。 V^i/S の評価は, 主として電子顕微鏡撮影による観察, あるいは光子相関法⁴⁻⁶⁾によりリポソーム粒径を算出して求められている。

2. イオン類の膜透過

各種イオンおよび参考としてブドウ糖と水の常温近傍における膜透過係数を示した (Table 1)。測定方法とし

Table 1. リポソーム膜におけるイオンの膜透過係数

透過物質	リポソームの性状	P [m/s]	温度 [°C]	文献
Na ⁺	LUV 卵黄 PC	1.0×10^{-14}	常温	7
	SUV PS	4.6×10^{-16}	"	8
	SUV PS/Chol (1:1)	3.4×10^{-16}	"	"
	LUV DPPC	1.0×10^{-12}	22	9
	SUV 卵黄 PC	$\sim 10^{-16}$	常温	10
	LUV 卵黄 PC	$\sim 10^{-12}$	22	11
K ⁺	SUV PA/卵黄 PC (4:96)	3.3×10^{-15}	"	12
	SUV PS	3.4×10^{-15}	常温	8
	SUV PS/Chol (1:1)	7.6×10^{-16}	"	"
Rb ⁺	LUV DPPC	1.0×10^{-12}	22	9
Cl ⁻	SUV PS	2.5×10^{-14}	常温	8
	SUV PS/Chol (1:1)	1.1×10^{-14}	"	"
	SUV 卵黄 PC	$10^{-13} \sim 10^{-15}$	"	10
<hr/>				
ブドウ糖	SUV PS	1.1×10^{-13}	常温	8
	SUV PS/Chol (1:1)	3.8×10^{-14}	"	"
H ₂ O/D ₂ O	SUV DPPC	1.2×10^{-5}	"	13

略号: PC: phosphatidylcholine, DPPC: dipalmitoyl PC, DMPC: dimyristoyl PC, PS: phosphatidylserine, Chol: cholesterol

では、多くの場合、リボソームからの放射性アイソトープの漏れ量を測定している^{7-10, 12)}。それ以外の方法として²³Naとシフト試薬を用いたNMRによる測定もある¹¹⁾。例外もあるがイオンの膜透過係数はSUV (Small Unilamellar Vesicle) では $10^{-14} \sim 10^{-16}$ m/s, LUV (Large Unilamellar Vesicle) では $10^{-12} \sim 10^{-14}$ m/sであり、ブドウ糖のそれは 10^{-13} m/s程度であることがわかる。

イオンの膜透過における最大の特徴はリン脂質の相転移温度近傍で最大の膜透過速度を示すことである¹⁴⁻²¹⁾。イオンの膜透過のメカニズムとしては次のようなモデルが考えられている^{22, 23)}。リン脂質は個々の分子が単独ではなく、数個から数十分子集合した小さなクラスターを形成している^{18, 24-27)}。これらのクラスターは安定ではなく、生長分裂を繰り返している^{27, 28)}。相転移温度近傍では、ゲル相と液晶相とのクラスターが混在し、その境界領域で透過速度が最大になる。イオンの透過はリン脂質表面上のいわば格子欠陥であるこの境界領域を通るのであると考えられている。イオン透過の活性化エネルギーは黒膜系の実験で35 kJ/molと求められている²⁹⁾。この数値は溶解拡散モデルで予測される活性化エネルギーと比べるとかなり小さく、上記モデルの妥当性を示している。

さて、リボソーム膜を通しての物質透過を細孔を通し

Fig. 2 DMPC リボソームにおける物質保持率 (23°C)³¹⁾
1 glucose, 2 sucrose, 3 raffinose,
4 PEG 900, 5 PEG 4000, 6 inulin,
7 dextran

ての透過と見なすとその細孔の大きさはどの程度であろうか。異なる分子量をもつタンパク質のリボソーム内水相からの漏れ量を測定して分子ふるい効果を調べることができる。そのようにして調べた結果、リン脂質中にできる細孔径は $0.5 \sim 2.0$ nm³⁰⁾、 $1.5 \sim 1.8$ nm³¹⁾であろうと推定されている (Fig. 2)。荷電物質の膜透過は単純な分子ふるいではないと思われるが、この実験結果は重要な知見といえよう。

最近、相転移温度で最大の膜透過係数を示さないイオンとして Rb⁺ の例が報告されている⁹⁾。この事実は、Rb⁺ と他のイオンの膜透過における温度依存性の違いを利用すればイオン選択的な透過膜を作ることが可能であることを示している。この例外も含めてイオンの膜透過に関しては系統的な研究はなく、さらに実験を積み重ねる必要があろう。

3. プロトンの膜透過

3・1 プロトンの膜透過の特異性

プロトンの膜透過は特に酸化的リン酸化機構における化学浸透説で重要な課題である。化学浸透説は、プロトンの低い膜透過速度を仮定している^{32, 33)}。ところが、最近発表されたプロトンの膜透過係数は Table 2 に示すように、他のイオンのそれに比べてオーダーで6~10桁大きい。また、タンパク質を固定化したリボソームの場合でも同程度の膜透過係数を示している³⁴⁾。さらに、黒膜系での実験でも同様の結果が得られている³⁵⁻³⁷⁾。プロトンや水の膜透過係数は温度の上昇に伴って単調に増加することが知られており、他のイオンの膜透過における相転移温度近傍で最大の膜透過係数を示すような温度依存性とは異なることが知られている³⁸⁻⁴⁰⁾。

3・2 プロトンの膜透過速度の測定方法

プロトンの膜透過過程は単にプロトンのみの輸送ではなく水酸イオンの輸送も同時に考慮する必要がある。プロトンと水酸イオンとの同時輸送方程式は、

$$J_{net} = -P_H ([H^+]^i - [H^+]^o) + P_{OH} ([OH^-]^i - [OH^-]^o) \quad (3)$$

プロトンと水酸イオンとは水中ではすばやく化学平衡に達するとすれば、 $[OH^-] = K_w/[H^+]$ と書けるから、

$$J_{net} = -P_{net} ([H^+]^i - [H^+]^o) \quad (4)$$

但し、 $P_{net} = P_H + P_{OH} K_w/[H^+]^i [H^+]^o$ (5)

実際の実験では pH 7 近傍での微小な pH 変化測定の場合が多く、

$$P_{net} \approx P_H + P_{OH} \quad (6)$$

Table 2 リポソーム膜におけるプロトンの膜透過係数

リポソームの性状	P_{net} [m/s]	実験方法	温度 [°C]	文献
LUV				
卵黄 PC	1.7×10^{-6}	pH ガラス電極	常温	41
卵黄 PC/PA (9:1)	9.3×10^{-6}	"	23	42
Chol/卵黄 PC/PA (10:9:1)	3.2×10^{-6}	"	"	"
PS	6.5×10^{-6}	"	"	"
卵黄 PC/CTAB (9:1)	2.1×10^{-7}	"	"	"
卵黄 PC	1×10^{-6} 以上	"	常温	43
大豆 PC	$10^{-5} \sim 10^{-6}$	"	25	44
卵黄 PC/PA (49:1)	1.4×10^{-6}	蛍光消光法	常温	7
ソラ豆の根のリン脂質	1.7×10^{-6}	pyranine 蛍光	25	38
diphytanoyl PC	1×10^{-6}	"	"	36
SUV				
大豆 PC	$10^{-6} \sim 10^{-8}$	pH ガラス電極	常温	45
dimyristoyl PA	1×10^{-7}	吸光度法	35	39
dimyristoyl PA	$(1 \sim 10) \times 10^{-6}$	"	65	"
卵黄 PC	5×10^{-9}	スピララベル法	常温	46
大豆 PC*	$10^{-5} \sim 10^{-6}$	pyranine 蛍光	25	47
大豆 PC*	$10^{-5} \sim 10^{-6}$	"	"	48
大豆 PC	3×10^{-5}	"	"	36

略号: PA: phosphatidic acid, CTAB: cetyltrimethylammoniumbromide, それ以外は Table 1 に同じ

*印は推定値

となるプロトンの膜透過によって生じるプロトンの濃度変化を求める場合は他のイオンの膜透過測定とは異なり, プロトンのバッファ容量 (B) を考慮する必要がある。すなわち,

$$dpH^i/dt = J_{net} \cdot B^i \cdot S/V^i \quad (7)$$

但し, $B^i = -(\text{系へ流入したプロトンによる濃度変化})/(\text{系の pH 変化})$ で定義する⁴⁹⁾。

実際の測定方法に関しては最近刊行された論文集⁵⁰⁾に詳しい。初期のプロトンの膜透過測定は pH ガラス電極を用いてリポソーム外水相 pH 変化を測定して求めていた⁴¹⁾。しかしながら, ガラス電極の pH 応答時間は 1 秒程度であることから, この方法では速い速度変化に追従できない欠点がある。また, リポソーム内水相に比べリポソーム外水相の体積はかなり大きいので ($V^i/V^o = 0.1 \sim 0.001$ 程度), リポソーム内水相の pH 変化に比べリポソーム外水相の pH 変化が小さく精度の良い pH 測定が困難である。他のリポソーム内水相の pH 測定方法として pH 依存性色素の吸光度変化を利用する方法³⁹⁾, 蛍光消光を用いる方法⁷⁾, NO ラジカルを用いる ESR での測定 (いわゆるスピララベル法)⁴⁶⁾ などがある。

Kano ら⁵¹⁾ は水溶性蛍光色素ピラニン (8-hydroxy-1, 3, 6-pyrenetrisulphonate) を DPPC-リポソーム内水相の pH の測定に応用した。ピラニンの酸解離定数は 7.2 であり, プロトン結合型ピラニンおよび解離型ピラニンとで蛍光の発光スペクトルが異なる。その違いを利用し, リポソーム内水相に封入されたピラニンの蛍光量変化の測定からリポソーム内水相の pH が測定できる。ピラニンをを用いたプロトンの膜透過速度の測定は Clement と Gould による一連の研究^{47, 52, 53)} がある。それによると, プロトンの膜透過過程には速いプロトンの膜透過過程 ($t_{1/2} \approx 1s$) とそれに続く遅いプロトンの膜透過過程 ($t_{1/2} \approx 5 \text{ min}$) の 2 種類の過程が存在する。また, カリウムイオンが水相中に大量に存在する状態で, カリウム輸送性キャリアである valinomycin を添加してゆくと単一の速度過程になる。この事実は, プロトン輸送によって生じた拡散電位差をカリウムイオンの逆向き輸送によってすばやく消去したため, (1) 式における $\Delta\mu$ が濃度差項のみになったためと解釈される。彼らは, 前者の過程をプロトンが単独に輸送され, 拡散電位差が生じる過程, 後者の過程は前者の過程の結果生じた拡散電位

差によってプロトンの輸送が制御される過程と考えた。

さて、(7) 式を用いてプロトンの膜透過係数を求める場合、リボソーム内水相のバッファ容量を測定することが困難なことから B^i の評価そのものがプロトン輸送における大きな誤差となりうる。リボソーム内水相のバッファ容量測定を滴定法により測定する場合は誤差が大きい。Kell ら⁴⁴⁾ は pH=4~9 の区間でバッファ容量が一定となるような塩組成の水溶液を工夫している。また、Grzesiek ら³⁶⁾ は、リボソーム内水相におけるプロトンのバッファ容量に作用する要素をリン脂質、ピラニンおよび緩衝液の 3 成分と考えて各々評価加算したうえでリボソーム内水相のバッファ容量を求めている。

3・3 プロトンの膜透過のメカニズム

プロトンの膜透過のメカニズムについては現在でも明確な結論はでていないが、Nichols と Deamer は 1 つの仮説を提出している^{41, 42)}。水や氷の中ではプロトンの移動速度は他のイオンの移動速度に比べて速い。特に、氷のように水の配置が固定化された系ではプロトンの移動速度は水に比べて 50 倍速いことが知られている⁵⁴⁾。また、プロトンの膜透過速度は他のイオンの膜透過速度に比べてオーダーで 6~10 桁大きい。それに比べて、水の膜透過速度 ($P=10^{-4} \sim 10^{-6}$ m/s) はプロトンの膜透過速度と同程度であることから、プロトンの膜透過機構は他のイオンの膜透過機構よりも水の膜透過機構との間により近い関係があると考えられる。実際に水は mmol/l のオーダーでアルケン中に溶解することが知られており⁵⁸⁾、リン脂質中のアシル基部位に存在する水分子がプロトンの移動に関与していると考えられる。また、膜タンパク質を介してのプロトンの移動過程ではアミノ酸残基側鎖中の水素結合を介してプロトンが伝達されるとも言われている⁵⁹⁾。このこととリン脂質中に存在する水分子とのアナロジーから、彼らはリン脂質中では水分子が鎖状につながっており、その水素結合を介してプロトンが移動するとしている。

このモデルに関する証拠はその後の多くの実験結果によって支持されている。プロトンの膜透過における活性化エネルギーは約 80 kJ/mol と求められ、単に拡散による活性化過程にしては大き過ぎ、水素結合の解離結合による過程に対応していると考えられる^{38, 39)}。また、膜の流動性に関する活性化エネルギーは 25 kJ/mol であることから、単に膜の摩擦抵抗のみがプロトン輸送における抵抗ではないことが示唆される³⁸⁾。Gutknecht ら³⁷⁾ は黒膜系実験で水の活量を変化させて実験を行っ

ている。その結果、水の活量が小さくなるに従い、プロトンの膜透過速度が小さくなることがわかった。この事実は膜中の水含量がプロトンの膜透過速度に対応することを示している。

4. 膜電位差の効果

近年、パルス電場をかけて細胞中に物質を注入する実験が盛んに行われている。リボソーム膜に及ぼす電場の効果に関しては、Zimmermann の総説⁶⁰⁾に詳しいが、電場はリボソーム膜に瞬間的に細孔を作り物質透過を促進することが知られている。パルス電場実験はリボソーム分散液に外部電場 E をパルス的にかけて行われる。その時に生じる膜を介しての電位差は、

$$\Delta\phi = 1.5 DE \quad (8)$$

であることが知られている⁶¹⁾。但し、 D はリボソーム外径である。ところで、式 (1) からわかることは膜を介しての電位差も荷電物質の膜輸送における駆動力となりうることである。しかしながら、 $\Delta\phi$ と ΔpH とでは荷電物質の輸送におよぼす効果が異なってくるが、パルス電場^{9, 45)}、拡散電位差^{62, 64)}、および黒膜による実験³⁷⁾で確認されている。実際、 $\Delta\phi = 150 \sim 200$ mV 程度 (パルス電場では 220~300 V/m) 以上になると荷電物質の透過速度の急激な増加が起きる (Fig. 3)。一方、 ΔpH が 3 (Δ 中では約 180 mV) 以下では (1) 式の関係が成立する。この実験結果については膜の流動性の変化で説明されたり⁶²⁾、膜の鏡像力を考慮するモデル⁴⁵⁾が提出されているが、はっきりとした説明はなされていない。

5. リボソームの構造による物質透過速度の違い

リボソームの構造、すなわち SUV, LUV そして MLV

Fig. 3 ΔpH と $\Delta\phi$ の物質透過に及ぼす影響⁶²⁾
 ΔpH (□) と $\Delta\phi$ (■) との効果は異なっている。

Fig. 4 相転移温度近傍における CF (carboxy fluorescein) のリポソームからの透過⁶²⁾

(Multi Lamellar Vesicle) でリン脂質の相転移温度近傍における物質透過速度のプロファイルが異なっていることが知られている (Fig. 4)⁶⁵⁻⁶⁸⁾。LUV では相転移温度近傍で鋭い物質透過のピークが存在するが、SUV や MLV では広がったピークとなっている。この実験事実は相転移温度近傍における超音波共鳴吸収⁶⁸⁾および示差熱ピークの広がり^{66, 67)}と対応している。

この実験結果を、リン脂質間の協同効果で説明する考え方は有力である。すなわち、LUV はその広がりのために SUV と比較して曲率の効果は小さく、したがってリン脂質間の協同効果は大きくなる。それゆえに LUV では小さなリン脂質クラスターが大量に存在してその境界部分が多くなり、物質透過の障壁が低くなると解釈するのである⁶⁶⁾。

ULV (Unilamellar Vesicle) と MLV との違いは何であろうか。まず、リン脂質のクラスターの緩和時間は MLV では ms 秒、ULV では μ 秒オーダーであることが知られている²⁷⁾。また、リポソームの作成法によって相転移温度の微妙なずれが存在する^{63, 70)}。しかしながら、これらの相異と相転移温度近傍での物質透過速度のプロファイルとの関係は不明である。さらに詳しい研究が必要であろう。

おわりに

各種荷電物質のリポソーム膜からの透過についてまとめた。この方面での研究の現状は、個々の物質の膜透過のメカニズムがやっとわかりかけてきた段階であると言える。

最近、アシル基部位に比べてあまり検討されていない親水基部位の研究も行われるようになってきた。例えば、リン脂質における親水基部位はバルクの水相部位に

比べて、プロトンの拡散速度の速いことが指摘され⁷¹⁾、実際に 20 倍速いことが実験的に示されている⁷²⁾。今後は、生体膜における物質輸送の研究は親水基部位も含めた検討が必要となるであろう。

本総説ではリポソームにおける物質透過のメカニズムに焦点をおいたために、その工学的な応用については特に触れなかった。現時点では、物質の膜透過速度の違いを積極的に応用する工学システム (例えば、イオン選択的濃縮膜、薬物輸送放出システムなど) は開発途上にあるとも言える。今後の重要な研究課題と思われる。

最後になりましたが、本総説を書くにあたり、ご助言をいただきました東京大学応用微生物研究所戸田清教授、矢部勇博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) J.H. Fendler : *Chem. Eng. News*, Jan. 2, 25 (1984)
- 2) G. Gregoriadis : *Trends Biochem.*, 3, 235 (1985)
- 3) C.G. Knight ed. "Liposomes from physical structure to therapeutic applications" Elsevier North-Holland, Amsterdam (1981)
- 4) R. Pecora, B.J. Berne : "Dynamic Light Scattering" Wiley, New York (1976)
- 5) B.A. Cornell, G.C. Fletcher, J. Middlehurst, F. Separovic : *Biochim. Biophys. Acta*, 642, 375 (1981)
- 6) A. Milon, J. Ricka, S.-T. Sun, T. Tanaka, Y. Nakatani, G. Ourisson : *Biochim. Biophys. Acta*, 777, 331 (1984)
- 7) J.W. Nichols, M.W. Hill, A.D. Bangham, D. Deamer : *Biochim. Biophys. Acta*, 596, 393 (1980)
- 8) D. Papahadjopoulos, S. Nir, S. Ohki : *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 561 (1971)
- 9) E.M. El-Mashak, T.Y. Tsong : *Biochemistry*, 24, 2884 (1985)
- 10) H. Hauser, D. Oldani, M.C. Phillips : *Biochemistry*, 12, 4507 (1973)
- 11) M.M. Pike, S.R. Simon, J.A. Balschi, C.S. Spinger : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 810 (1982)
- 12) S.M. Johnson, A.D. Bangham : *Biochim. Biophys. Acta*, 193, 82 (1969)
- 13) R. Lawaczeck : *Biophys. J.*, 45, 491 (1984)
- 14) M.C. Blok, E.C.M.V.D. Neut-Kok, L.L.M.V. Deenen, J.D. Gier : *Biochim. Biophys. Acta*, 406, 187 (1975)
- 15) D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, T. Isac : *Biochim. Biophys. Acta*, 311, 330 (1973)
- 16) S.H. Wu, H.M. McConnell : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 484 (1973)

- 17) D. Marsh, A. Watts, P.F. Knowles : *Biochemistry*, **15**, 3570 (1976)
- 18) T.Y. Tsong, M. Greenberg, M. I. Kanehisa : *Biochemistry*, **16**, 3115 (1977)
- 19) T.Y. Tsong : *Biochemistry*, **14**, 5409 (1975)
- 20) H.J. Pownall, Q. Pao, D. Hickson, J.T. Sparrow, S.K. Kusserow, J.B. Massey : *Biochemistry*, **20**, 6630 (1981)
- 21) M.A. Singer, L. Fingold : *Biochim. Biophys. Acta*, **816**, 303 (1985)
- 22) S. Doniach : *J. Chem. Phys.*, **68**, 4912 (1978)
- 23) J. F. Nagle, H. L.Scott : *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 236 (1978)
- 24) A.G. Lee : *Biochim. Biophys. Acta*, **472**, 237 (1977)
- 25) E. Freire, R. Biltonen : *Biochim. Biophys. Acta*, **514**, 54 (1980)
- 26) B. Snyder, E. Freire : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2684 (1980)
- 27) M.I. Kanehisa, T.Y. Tsong : *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 424 (1978)
- 28) T.Y. Tsong, M.I. Kanehisa : *Biochemistry*, **16**, 2674 (1977)
- 29) J.R. Smith, D.R. Laver, H.G.L. Coster : *Phys. Chem. Lipids*, **34**, 227 (1984)
- 30) L.F. Bragauza, B.H. Blott, T.J. Coe, D. Melville : *Biochim. Biophys. Acta*, **731**, 137 (1983)
- 31) P. Hoogevest, J. Gier, B.D. Kruijff : *FEBS Lett.*, **171**, 160(1984)
- 32) P. Mitchell : *Nature*, **191**, 144 (1961)
- 33) P. Mitchell : *Biol. Rev.*, **41**, 445 (1966)
- 34) H. Matsuoka, I. Yabe, K. Toda : *J. Chem. Eng. Jpn.*, **20**, 392 (1987)
- 35) J. Gutknecht, A. Walter : *Biochim. Biophys. Acta*, **645**, 161 (1981)
- 36) S. Grezesiek, N.A. Dencher : *Biophys. J.*, **50**, 265 (1986)
- 37) J. Gutknecht : *J. Memb. Biol.*, **82**, 105 (1984)
- 38) M. Rossignol, P. Thomas, C. Grignon : *Biochim. Biophys. Acta*, **684**, 195 (1982)
- 39) K. Elamrani, A. Blume : *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 22 (1983)
- 40) W.G. Pohl : *Z. Naturforsch.*, **37c**, 120 (1982)
- 41) D.W. Deamer, J.W. Nichols : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 165 (1983)
- 42) J.W. Nichols, D.W. Deamer : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2038 (1980)
- 43) Y. Nozaki, C. Tanford : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4324 (1981)
- 44) D.B. Kell, J.G. Morris : *J. Biochim. Biophys. Methods*, **3**, 143 (1980)
- 45) G. Krishnamoorthy, P.C. Hinkle : *Biochemistry*, **23**, 1640 (1984)
- 46) D.S. Cafiso, W.L. Hubbell : *Biophys. J.*, **44**, 49 (1983)
- 47) N.R. Clement, J.M. Gould : *Biochemistry*, **20**, 1534 (1981)
- 48) C.M. Biegel, J.M. Gould : *Biochemistry*, **20**, 3474 (1981)
- 49) P. Mitchell, J. Moyle : *Biochem. J.*, **104**, 588 (1967)
- 50) L. Packer ed. : *Methods Enzymol.*, **127**, 746 (1986)
- 51) K. Kano, J. Fendler : *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 289 (1978)
- 52) N.R. Clement, J.M. Gould : *Biochemistry*, **20**, 1539 (1981)
- 53) N.R. Clement, J.M. Gould : *Biochemistry*, **20**, 1544 (1981)
- 54) M. Eigen, L.D. Mayer : *Proc. R. Soc. Lond. A*, **247**, 4507 (1958)
- 55) N.P. Franks, W.R. Lieb : *J. Mol. Biol.*, **141**, 43 (1980)
- 56) J.D. Gier, J.D. Mandersloot, L.L.M.V. Deenen, *J. Biol. Chem.*, **150**, 666 (1968)
- 57) R. Bittman, L. Blau : *Biochemistry*, **25**, 4831 (1972)
- 58) P. Schatzberg : *J. Polym. Sci. Part C*, **10**, 87 (1965)
- 59) 例えば, J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle : *J. Memb. Biol.*, **74**, 1 (1984)
- 60) U. Zimmermann : *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 227 (1982)
- 61) J. Teissie, T.Y. Tsong : *Biochemistry*, **20**, 1548 (1981)
- 62) P.S. O'Shea, S. Thelen, G. Petrone, A. Azzi : *FEBS Lett.*, **1573**, 103 (1984)
- 63) P. O'Shea, S. Feuerstein-Thelen, A. Azzi : *Biochem. J.*, **220**, 795 (1984)
- 64) P.O'Shea, G. Petrone, R.P. Casey and A. Azzi : *Biochem. J.*, **219**, 719 (1984)
- 65) J.F. Nagle : *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **31**, 157 (1980)
- 66) N. Duzgunes, J. Wilschut, K. Hong, R. Fraley, C. Perry, D.S. Friend, T.L. James, D. Papahadjopoulos : *Biochim. Biophys. Acta*, **732**, 289 (1983)
- 67) D. Lichtenberg, E. Freire, C.F. Schmidt, Y. Barenholtz, P.L. Felgner, T.E. Thompson : *Biochemistry*, **20**, 3462 (1981)
- 68) V.M. Maynard, R.L. Magin, F. Dunn : *Chem. Phys. Lipids*, **37**, 1 (1985)
- 69) R. Magin, M.R. Niesman : *Chem. Phys. Lipids*, **34**, 245 (1984)
- 70) R.A. Parente, B.R. Lentz : *Biochemistry*, **23**, 2353 (1984)
- 71) T.H. Haines : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 160 (1983)
- 72) J. Teissie, M. Prats, P. Soucaille, J.F. Tocanne : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3217 (1985)