生体膜研究における NMR の応用*

吉 川 研 一** 寺 田 弘***

1. はじめに
2. NMR の基礎
3. モデル膜の構造と流動性
4. モデル膜と薬物との相互作用
5. 透過現象への応用
6. 生体膜系への応用
7. おわりに

1. はじめに

現在の生体高分子系の研究において最も重要なことの一つは、生命活動にあずかるタンパク質や核酸等の構造をその機能との関連でとらえること、すなわち高分子をその活動の場で動的にとらえることであろう。そのためには生体高分子を構成している分子を識別できるほどの高分解能を有する分析法が要求される。タンパク質や核酸の実像を初めてとらえたX線回折は、分解能の点では優れた方法であったが、動的な構造の観察という点で限界がある。これに対して核磁気共鳴吸収 (NMR) 法は動的構造に関する情報を与える有効な方法である。従来主として有機化学の分野で用いられてきた NMR が、装置の著しい改良により、酵素や核酸の動的構造の研究にも盛んに応用されるようになったのはその優れた分解能からみても当然であろう。

一方、生体高分子系としてのもう一つの領域である膜系への応用は、試料が不均一系であるという理由もあって、他の高分子系に比してかなりの遅れをとっているように思える。しかしながら最近になって NMR による研究が種々の膜系において盛んになされるようになり、それらの内容も模索の時期を過ぎた感がある。生体膜系における動的構造を明らかにするには他の系で行われているよりもより巧妙な方法を駆使しなければならず、こ

れは必然的に新しい方法論の発展をうながさざるを得ない。その意味からも、生体膜系における NMR の応用は興味ある研究対象であろう。本稿では初めに NMR の基礎について簡単に解説した後、膜の動的構造 (流動性)、膜と薬物の相互作用、透過性、生体膜系での直接測定等の研究について概説する。

2. NMR の基礎

原子核は陽電荷を帯びているため、それが自転 (スピン) すると電流を生じ、核は小さな磁石としての性質をもつようになる。この状態を核が磁気モーメントをもつという。 ^4He , ^{12}C などの多少の例外を除き、大多数の原子核にはこのような性質がある。そこで核磁気モーメントを有する核 (核スピンの0でないもの) が外部磁場 H_0 の中に入ると、磁場の大きさに比例した相互作用が生じる。この相互作用のエネルギー ($\Delta E = \gamma \hbar H_0$; ただし γ は磁気回転比といい原子核に特有な定数) と等しいエネルギーの電磁波 $h\nu$ を照射するとその吸収が観測さ

れる。これが核磁気共鳴の原理であり、例えば水素原子 (^1H) では、23.5 KG (キログauss) の磁場中 100MHz (メガヘルツ) のラジオ波の吸収がみられる。各々の核は異なった磁気モーメントをもつために、一定の磁場中でも異なった振動数のラジオ波を吸収する。ここで一般に核スピンの $1/2$ のものが高分解能のシグナルを与え、1 以上になると核四極子が生じその効果のため線幅が広がり、測定がむずかしくなる。現在、生体膜の研究によく用いられているのは、 ^1H , ^{13}C であるが、最近では後述するように ^{31}P を用いた研究も盛んになってきた。以下スペクトルの解析法とそこから得られる情報について簡

* Recent Progress in NMR in the Study of Biomembranes

** K. Yoshikawa: 徳島大学教養部 (〒770, 徳島市南常三島 1-1)

*** H. Terada: 徳島大学薬学部 (〒770, 徳島市庄町 1)

Fig. 1 ATP の ^{31}P NMR スペクトル. (スペクトル巾約 22ppm)
 ("Annual Reports on NMR Spectroscopy,"
 vol 5B, ed., by E. F. Mooney, Academic
 Press (1973).)

単に述べる。

化学シフト

Fig. 1 に、ATP の $^2\text{D}_2\text{O}$ ($^2\text{H}_2\text{O}$) 中での NMR スペクトルを示してある (スペクトルの右側が高磁場側)。 α , β , γ の ^{31}P 核がそれぞれ異なった位置にみられる。このように、同種の核でありながらその環境が異なるために生じる共鳴位置のずれを、化学シフト (chemical shift) と呼ぶ。通常、 ^1H , ^2D では外部磁場の大きさに比べ 10^{-5} 程度 (1KG の磁場中 10mG 程度、即ち 10ppm 程度) の化学シフトがあり、その他の核では、 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 程度 (1000~100ppm) の化学シフトがみられる。一般に化学シフトは外部磁場の大きさに比例するのでその 10^{-6} , すなわち ppm 単位で表わす。 ^1H , ^2D の化学シフトは原子上の電荷密度や水素結合の強さ、まわりの官能基によるしゃへい効果、溶媒の誘電率のちがいなどによって引き起こされる¹⁾。これ以外の核種では、 ^1H , ^2D に比して化学シフトの範囲が広いが、これは主として p 電子の状態の変化——例えば、 p 軌道上の電子密度や隣接基との結合状態 (結合次数や軌道エネルギー) の変化——に起因している²⁾。

スピン結合

Fig. 1 をみると、 α , γ のシグナルは 2 本に、 β では 1:2:1 の 3 本に分裂しているが、これは互いに隣接したリンの核スピンどうしの相互作用によるもので、その分裂のしかたは、隣接する核の種類、数および結合状態に依存する。スピン結合による分裂の大きさから分子の

立体構造に関する知見が得られることが多い³⁾。しかしながら生体高分子では、各シグナルの線幅が増大し、しかもそれらが互いに重なり合うのでスピン結合の観測は一般に困難である。

緩和時間

NMR で、緩和時間には 2 種類あり、一つは縦緩和時間* (T_1)、もう一つは横緩和時間* (T_2) という。核磁気モーメントをもつ核に外部磁場をかけると核スピン状態が分裂し、Boltzmann 分布に従ってそれぞれの準位の核の数が決まる。このとき、より安定な準位を占める確率が多くなり、その結果巨視的な「磁化」が生じる。この「磁化」を何らかの方法で平衡からずらし、平衡の状態に回復する速さを測定しこれから T_1 を求める。 T_1 はスピンの各準位にとどまる寿命 (或いは準位間の遷移速度の逆数) に相当している。核がスピン準位間を遷移する際、分子の回転や併進運動 (一般にこれらの運動系を格子系という) との間でエネルギーのやりとりが起こる

る。そこでスピン系のエネルギーが格子系に移りやすい状態になると T_1 が短くなるわけである。そのため、 T_1 はスピン-格子緩和時間ともいわれる。格子とスピン系との間でエネルギーのやりとりの起こりやすさは分子の運動状態或いは温度に依存する。そこで一般に T_1 はある温度で極小値をとる。

一方、 T_2 はスピン-スピン緩和時間ともいい、核スピンの才差運動の位相の乱れる速さに関係している。そして実際には、準位の異なるスピンどうしの交換と、エネルギーをやりとりしないスピン間の相互作用の両者が T_2 の原因となる。両者の間には $T_1 \geq T_2$ の関係があり、低温 (分子の運動が遅いとき) では前者が、高温分子の運動が速いとき) では**後者が重要になる。今、シグナルの半値幅を $\nu_{1/2}$ 、磁場の不均一性を ΔH とすると通常は以下の関係が成り立つ。

$$\pi\nu_{1/2} = 1/T_2 + \gamma\Delta H/2$$

* 磁場の方向を縦、その直交方向を横とする

** 低分子化合物では、通常ある温度以上になると、吸収線は極度に先鋭化する。この条件では $T_1 = T_2$ である。

Fig. 2 レシチン vesicle の 220 MHz ^1H NMR スペクトル⁶⁾. (A) は径約 300 Å, (B) は約 900 Å の vesicle. 小さい方の vesicle が, また温度が高いほど, 高分解能のスペクトルを与えることに注意されたい.

そこで T_2 が短く, 磁場の不均一性を無視できる場合は, 吸収線の半値幅から T_2 を求めることができる. それに対して T_2 が比較的長く (約 0.1 sec 以上), 線幅が狭い場合は, 磁場の不均一性による効果を取り除くためにスピン・エコー法などの特殊な測定が必要になる²⁾.

3. モデル膜の構造と流動性

生体膜は, 各種のリン脂質, リポタンパク, ステロールなどから構成されており, それらの組み合わせにより生体膜の機能の維持がなされている. Singer-Nicolson の流動モザイクモデル³⁾が出されて以来, 「静的」な膜のモデルよりもその「動的」な構造が膜機能との関連でより重要であると考えられるようになってきた⁴⁾. 膜の構造研究には, X線回折, 電子顕微鏡, ラマンスペクトルなどが応用されている⁴⁾が, これらの方法では, 膜の「動的」な挙動に関する情報を得ることはむずかしい. これに対して, ESR を用いるスピンラベル法は, 膜の流動性を研究するのに役立ち, リン脂質やステロールにニトロキシド基を結合させた「スピンラベル試薬」を用いた研究が数多くなされている⁵⁾. スピンラベル法は, ラベルした化合物の運動状態やそのまわりの雰囲気について詳しい情報を与えてくれる. しかしながらこれらの

方法では, ①同一の膜を構成している脂質, ステロール, タンパクなどの運動状態や分子内の各部分の運動状態についての細かい知見は得難く (例えば, リン脂質の親水部分と側鎖の運動状態の違い), 詳しい研究を行うためにはいろいろな構造をもつスピンラベル試薬を合成しなければならない. ②スピンラベルした試薬 (異物) を膜に取り込ませるため, これによる影響が考えられる. ③水やイオンの透過性については間接的な情報しか得られない. 更に, ④スピンラベル法では $10^{-11} \sim 10^{-9}$ sec の範囲の回転時間の運動については鋭敏な情報が得られるが, それ以上遅い運動についてはあまりよくわからない*, などの問題がある. NMR による膜の流動性に関する研究は, 1970 年代に始まったばかりであるが, ESR やその他の分光法では得ることのできない知見が得られるようになってきた. そこで膜の流動性が NMR のスペクトルではどのように観測されているかをみてみることにする.

Fig. 2 に卵黄レシチンを 0.1M NaCl 水溶液中で超音波処理して得られた vesicle** の 220MHz ^1H NMR ス

* NMR ではこれよりも遅い運動に関する情報を得やすい.

** 本稿で vesicle とはリン脂質二重層より成る liposome を意味する.

ペクトルを示した⁶⁾。温度が上昇すると脂質分子の運動が激しくなり、それに伴って線幅が狭く (T_2 が長く) なっていることがわかる。また vesicle の小さい方 (Fig. 2A) が高分解能のシグナルを与えている。これについて Finer は⁷⁾、小さな vesicle の方が vesicle 全体の回転運動が速いためであると考えた。これに対して Horwitz ら⁸⁾、Seiter ら⁹⁾、Lichtenberg ら¹⁰⁾ は詳細な研究を行い、小さな vesicle では膜表面の曲率が大きいので、リン脂質の側鎖間のすき間が多くなり、その結果リン脂質の運動が激しくなり、シグナルの線幅が狭くなると結論づけている。

一方、Seelig ら^{11~13)} は選択的に重水素化したレシチンの multilayer な vesicle の構造を ^2D NMR により研究した。ここで彼らは、レシチンの炭化水素鎖の秩序性は末端にいくに従い低下すること、またレシチン全体の秩序性はスピントラベル法によって得られたものよりかなり高いことを見出した。このような2つの測定法による違いは、異なった速度の運動を観測しているという理由では説明できない。彼らはスピントラベル試薬が脂質二重層の構造を乱し、この効果が無視できないほど大きいためであると結論づけている。その他、レシチンの側鎖を変化させたときの vesicle の安定性¹⁴⁾ や超音波処理をせずに調製した vesicle¹⁵⁾ についての研究もなされている。

生体膜では、ステロール類が膜の流動性や機能に重要な影響を与えている。リン脂質二重層は、ステロール類が存在すると転移温度 (T_c) 以下では膜をより流動的に、 T_c 以上ではより運動を押えるという二相性があることが知られている⁴⁾。しかしながら、リン脂質とステロールのどの部分が相互作用をするのか、あるいはどの部分の運動性がどのように変化するかについては不明な点が多かった。このため、ステロールや脂質の組成を変化させた vesicle の NMR による研究が行われた。レシチンとコレステロールよりなる vesicle のスペクトルでは、レシチンの側鎖のメチルおよびメチレン基の水素の線幅が増大してくる (Fig. 3)¹⁶⁾。Finer らによるとこれはレシチンとコレステロールが、30msec 以上の寿命をもつ 1:1 の complex を作り、これにより側鎖の運動が強く束縛されたからであるとしている^{16,17)}。これに対して Kroon らは完全に重水素化した脂肪鎖をもつレシチンを用いて、コレステロールと共存させた vesicle を作り、 ^1H NMR を測定するとコレステロールの C-26, 27 のメチル基水素は高分解能 (線幅が狭い) のシグナル

Fig. 3 レシチンコレステロール系の vesicle の 220 MHz ^1H NMR スペクトル (5%卵黄レシチン, 重水溶媒, 20°C)¹⁶⁾. (a)レシチン, (b)レシチン:コレステロール, モル比 2:1, (c)レシチン:コレステロール, モル比 1:1. (δ 4~5 の H₂O の強いシグナルは消去してある.)

を与えることを見出した¹⁸⁾。このことは少なくとも、C-26, 27 のメチル基は比較的自由に運動していることを示している¹⁸⁾。一方、スピントラベル法による研究では、平面のステロイド骨格の 3β 位に単一の水酸基を有するステロールは膜の秩序を増大させ、それには C-17 の炭素鎖が有効であるが、C-5 の二重結合は重要でないという結論が得られている¹⁹⁾。

生体膜を構成している種々のリン脂質、ステロール、タンパクの膜内での分布状態を知ることは、膜研究の中でも重要な課題である。膜の内層、外層における脂質分布を研究する手段としては、種々の金属イオンを膜の外

Fig. 4 重水中、卵レシチン vesicle の ^1H NMR スペクトル (pD 7.4)²²⁾. 下図：常磁性イオンの存在しないとき。上図：vesicle 外側に 150 mM の $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の存在するとき。

側や内側に入れてシグナルを分離する方法²²⁻³⁶⁾ が確立されている*。すなわち、常磁性金属イオンは電子スピンによる磁性をもっているが、この磁気モーメントは核に比して 10^3 程度の大きさがあるので、それが測定試料中に存在するとスペクトルに著しい変化をもたらす。常磁性イオンの中でも Pr^{3+} (プラセオジウム)、 Eu^{3+} (ヨーロッパウム)** などは、リン脂質分子のリン酸基などの負電荷を帯びた部分に、また $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ は** リン脂質のコリン部分の四級アンモニウムなどの正電荷の基に結合し、その付近の核のシグナルをシフトさせる。これに対して Mn^{2+} 、 Gd^{3+} (ガドリニウム) など** は、イオン

* 常磁性金属イオンを加えなくても ^1H NMR²⁰⁾ や ^{31}P NMR²¹⁾ により膜内外層のシグナルを分離して観測できる場合がある。

** Mn^{2+} 、 Gd^{3+} などは電子スピン緩和が遅いので、NMR の T_1 、 T_2 を著しく短くする。この効果は一般に金属と核との距離の 6 乗に反比例する。一方、 Eu^{3+} 、 Pr^{3+} 、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ などでは緩和時間に対する効果よりも常磁性シフトを誘起する効果の方が著しい。このシフトは、普通は双極子相互作用の大きさ $[(1-3\cos^2\theta)/r^3]$ に比例する²¹⁾。

Fig. 5 Vesicle 内に 150 mM の $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ をとりこませたときの ^1H NMR スペクトル²²⁾

からの距離の 6 乗に反比例して線幅を増大させる効果があり、その結合により周辺の核の線幅は顕著に増大する。そこでこれらの金属イオンを膜の一方の側だけに存在させることによって膜の内外両層における脂質を見分けることができる²²⁻²⁸⁾。Fig. 4, 5 はレシチンのみより成る vesicle の外側に $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ を加えた場合 (Fig. 4) と、膜の内側に取り込ませたとき (Fig. 5) のスペクトルである²²⁾。 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ がいない場合には単一のシグナルであった N -メチル基水素が、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 存在下では 2 本に分裂していることがわかる。それぞれのシグナルの面積比から、外側には内側の 1.8 倍のレシチンが存在していることがわかる。膜内外両層における分布の違いは vesicle が小さい ($\sim 200\text{\AA}$) ので外層の表面積が内層のそれに比してかなり大きいためであるとして説明することができる。同様の結果は、 ^{31}P NMR スペクトルでランタニドイオンにより分離したレシチンのリン酸基のシグナルを測定することによっても得られている²³⁾。

常磁性イオンを用いて膜内外の組成を研究する方法は 2 種以上の成分から成る vesicle にも応用することができる^{22,29-33)}。例えば、Berden ら²²⁾ は、レシチンと phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid との二成分系の vesicle では、レシチンは内側により多く分布し、レシチンと sphingomyelin より成る vesicle では、レシチンは外側に多く存在することを見出している。彼らは、親水性部分の荷電の程度と側鎖の詰まり具合が共に vesicle 内外両層の分布に重要な影響を与えていると結論

している。また Yeagle ら²⁹⁾は、 ^{13}C を enrich したレシチンを用いて ^{13}C NMR を測定し、不飽和結合をもつレシチンは外層に集まりやすいことを見出している。Gent と Prestegard³⁰⁾は ^1H NMR で、de Kruijff ら³¹⁾は ^{31}P NMR により、レシチンとコレステロールから成る vesicle でも同様の研究を行っている。この場合コレステロールは内側に集まりやすく、コレステロールが 30mol % を越えると vesicle の大きさは急激に増大し、遂には multilayer になると結論づけられている。この他、vesicle 中にオリゴペプチドを含ませた系での膜の内側と外側のリン脂質の組成に関する研究^{34~36)}なども行われはじめているが、これらはより生体膜に近いモデルにおける研究として期待される³⁷⁾。

以上のことから、少なくともモデル膜系では NMR により種々の情報が得られることがわかる。しかしながら、上述のように超音波処理した vesicle では、その表面の曲率が大きいので脂質の詰まり方が密ではないことに注意する必要がある。このことは、次の節の薬物と膜の相互作用に関する研究についてもあてはまり、モデル膜で得られた知見が実際の生体膜にそのまま有効であるとは限らない。

4. モデル膜と薬物との相互作用

NMR を薬物そのものの立体構造や溶媒との相互作用に応用した研究例は非常に多い。NMR は、薬物の環境による状態の変化を分子レベルで研究することを可能にしている。例えば、生体膜系に作用する薬物の一つであるアンカプラー³⁸⁾としてよく用いられている SF 6847³⁹⁾ (3, 5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzylidenemalononitrile) は、メタノール、水などの水素結合性溶媒中と DMSO などの非水素結合性溶媒中とでは分子の電子状態が変化することが明らかになっている⁴⁰⁾。しかしながら、NMR は蛍光スペクトルなどに比べて感度が非常に低いために、膜に取り込まれた低濃度の薬物の状態を研究するには必ずしも適しているとはいえない。そこで本節では、生体膜系における薬物の状態に関する研究は省略し、薬物により膜の構造や流動性がどのように変化するかに注目した論文^{41~55)}のうちのいくつかを紹介したい。

局所麻酔剤は、膜の流動性の変化をひき起こすと一般に考えられている。Shieh ら⁴¹⁾は、局所麻酔剤の chloroform, halothane, methoxyflurane, enflurane などを含んだレシチンの vesicle を作り、その ^1H NMR を

Fig. 6 1, 2-Dihexadecyl-sn-glycero-3-phosphocholine vesicle (1.98 w/w%) の Halothane によるスペクトル変化 (^1H , 100 MHz)⁴¹⁾. (a) Halothane 62.8mm, (b) 31.5mm, (c) Halothane 無添加.

測定するとレシチンの側鎖のシグナルの線幅が減少 (T_2 が増加) すること、すなわち膜の流動性が増大することを見出した (Fig. 6). 更にその化学シフトから、これらの薬物は低濃度では親水性の環境下に存在していると推定している。また Fernandez と Cerbon⁴⁸⁾ はレシチンのコリン部分のシグナルの常磁性金属イオン (Pr^{3+}) による変化に対する tetracaine の影響を調べた。先に述べたように常磁性金属イオンにより膜の内外両層に位置する *N*-メチル基のシグナルを分離することができるが、tetracaine の添加により Pr^{3+} による常磁性シフトは解消された。彼らは tetracaine が、リン酸基に結合した Pr^{3+} を膜表面から取り除くために上記のような効果があらわれたと解釈し、tetracaine は膜表面から Ca^{2+} な

tetracaine

どの金属イオンを除去し、これがその麻酔作用と密接に関連していると推定している。

ビタミンE (α -tocopherol) は抗酸化作用を有しているが、その作用機序は不明点が多い。最近では、その長い疎水性の炭化水素鎖と親水性のクロマン環-OH 基の存在から生体膜の流動性に対する影響が注目されるようになった⁴³⁾。Cushley と Forrest は⁴⁴⁾、ビタミンE を取り込ませたレシチン vesicle の ^{13}C NMR スペクトルを測定した結果レシチンの炭化水素鎖の各部および極性部の T_1 は全般的に無添加の場合に比して 50~60% 増加したが、特に極性基であるリン酸およびコリン部分の増加が phytanic acid などの両親媒性物質の添加による T_1 変化に比して著しいことを見出した。これはビタミンE 添加により vesicle の二重膜の膨張がもたらされ、レシチン分子の自由度が増大していることを意味している。更にクロマン環の-OH 基はレシチンの極性部と直接相互作用を行わないと推定されている。また vesicle 内部に trap された Pr^{3+} の透過性を ^{31}P NMR によって調べたところ、ビタミンE 添加により透過性の増大が見られた事からも上の結論は支持されるという。しかしながらこの実験では生理条件を上回る多量のビタミンE (25mol %) を加えているなど彼らの結論が生体系でどの程度有効であるかについては明らかでない。

アルカリ金属イオンやアルカリ土金属イオンと複合体を形成し、これらのイオンの膜透過性に変化をもたらすいわゆるイオノフォア ionophore⁴⁵⁾、(コンプレクソン complexon ともいう) の生体膜との相互作用も興味深い研究テーマである。valinomycin⁴⁶⁾、マクロライドアクチン類⁴⁷⁾などのイオノフォアの種々の条件下における立体構造の研究において NMR は有効性を発揮しているが、最近では、生体膜系に対する作用も研究され始めている。例えば Fernandez ら⁴⁸⁾によって、X-537A (Ca^{2+} のイオノフォアとしてよく用いられる) が存在すると、 Pb^{2+} が脂質二重層を透過するようになることが明らかにされた。また、alamethicin をレシチンに対して数百分の1モル加えるとレシチンの N -メチルと脂肪鎖のシグナルの線幅が著しく増大する⁴⁹⁾。これは、alamethicin が界面活性剤としての性質をもちレシチンのコリン部分に結合し、vesicle を融合し、更には fusion を引き起こすからである^{50,51)}。

5. 透過現象への応用

種々の物質のモデル膜および生体膜に対する透過性の

研究は、非常に興味ある課題であるが、NMR では測定上の制約のためにそのほとんどは水の透過性の研究にあてられている。しかし最近になってようやく水以外の物質の透過性に関する報告も見られるようになってきた。

透過性の研究は対象とする物質の NMR スペクトル上の特長を巧妙に利用しなければ不可能である。透過速度が小さく、細胞内部のシグナルが medium 中のシグナルと区別できる物質の場合には、スペクトルの強度の変化から透過速度を見つめることが可能である。

例えば Cramer と Prestegard⁵⁶⁾ はマレイン酸とフマル酸の酸解離性のちがいを利用し、レシチン-コレステロール (モル比: 2:1) より成る vesicle の外液を酸性にしたときの輸送現象 (受動輸送) を、 ^1H NMR をもちいて研究した。pH 7 で内側にマレイン酸、外側にフマル酸を入れ外側の pH を 4.7 にすると 1~2 分で外液中のフマル酸の40%が膜内側に移行した。これに対し、外側の pH が 5.1 のときはフマル酸の膜内への移行はほとんどみられなかった。フマル酸の酸解離定数 pK_a 値が 3.03 と 4.47 であることを考慮すると、プロトンを解離していない分子型が膜内を通過していることが示唆される。

一方、透過速度の大きい場合には一般的に細胞内外のシグナルを分離できず、緩和速度の測定など複雑な取り扱いが必要となる⁵⁷⁾。その典型的な例は、水の場合である。

生体膜系における水の ^1H NMR は単一のシグナルを与える。これに対し、リン脂質膜不透過性のイオンである Mn^{2+} は、 $^1\text{H}_2\text{O}$ の T_1 , T_2 を著しく低下させることが水溶液での研究で明らかにされているのでこれを利用することにより水の透過速度が測定できる。Andrasko と Forsen は⁵⁸⁾、リン脂質の vesicle の内部に Mn^{2+} を取り込ませた系の $^1\text{H}_2\text{O}$ の T_1 , T_2 を測定した。この場合、水の膜内外での交換速度が速いため、 $^1\text{H}_2\text{O}$ は単一の緩和時間をもち Fig. 7 のような温度変化を示す。いま、緩和時間を T_1 (T_1 または T_2)、vesicle 内の水 (B) の割合を P_B 、寿命 (交換速度の逆数) を τ_B 、緩和時間を T_{1B} とすると、低温側では、

$$1/T_1 = P_B/\tau_B$$

が成立し、寿命が緩和時間に主として寄与するが、高温側 (図の左側) では、

$$1/T_1 = P_B/T_{1B}$$

となり、vesicle 内の水の緩和時間 T_{1B} (Mn^{2+} の存在により非常に短くなっている) が実測される緩和時間

Fig. 7 Dipalmitoyl lecithin vesicle— Mn^{2+} (vesicle 内) 系での 1H_2O , T_1 , T_2 の温度依存性⁵⁸⁾.

Mn^{2+} 0.043M での T_1 (□), T_2 (■).
 Mn^{2+} 0.060M での T_1 (△), T_2 (▲).
 Mn^{2+} 0.090M での T_1 (○), T_2 (●).

T_1 を支配するようになる^{59,60)}. P_B は vesicle の内容量がわかれば比較的容易に推定でき、また $(1/T_{1B})$ は Mn^{2+} の濃度に比例するのでこれらの関係を用いると水の交換速度や活性化エネルギーを求めることができる。このようにして求めた τ_B は膜の転移温度付近で最小値をとり、水透過の活性化エネルギーは $16\sim 35^\circ C$ の範囲では、 15 ± 1 kcal/mol であると報告されている⁵⁸⁾。しかしながらこの研究に際しては、① Mn^{2+} が膜外に leakage していない ② Mn^{2+} が膜表面に結合せずに vesicle 内部の medium 中に均一に分布している——などの仮定がなされておりそれらの妥当性を確かめる必要がある。Haran と Shporer は⁶¹⁾, $^{17}O^*$ を enrich した水中でレシチンの vesicle を作り、 ^{17}O の NMR に対する Mn^{2+} イオンの効果を測定し、vesicle 内外の水が異なった緩和時間をもつことを利用することによって水

* 1H を 2D や 3T などの同位体置き換えて生体系の研究を行うときは、「同位体効果があるものとして注意しておく必要があるが、 ^{16}O を ^{17}O に換えた場合は、この効果は非常に小さく、無視しても余り大きな問題はないと考えられている。

Fig. 8 放射菌 1H NMR スペクトルの pH 依存性 (60MHz)⁷²⁾.

1H_2O (左), メチレン水素(右) によるシグナル。左右の図の scale が大きく異なること、また右図では各 pH で 2 回ずつ掃引 (少し異なる強度で) していること、に注意されたい。

の透過に関する研究を行った。彼らによると vesicle (直径 ~ 500 Å) 中の水の平均寿命は $22^\circ C$ で 1 ± 0.1 m sec, 活性化エネルギーは 12 kcal/mol である。彼らは同様の方法をヒトの赤血球にも応用し⁶²⁾, 交換の速度定数は $25^\circ C$ で 60 sec^{-1} (寿命は約 17 msec), $37^\circ C$ で 107 sec^{-1} (寿命約 9.3 msec) であると報告している。この値は、Conlon による 1H NMR からの寿命 $3.8\sim 8.5$ msec ($37^\circ C$)⁶³⁾ とよく対応した値になっている。

Mn^{2+} はリン脂質膜では不透過性であるが、ラット肝ミトコンドリア膜では、内部に能動的に取り込まれることが知られている。 1H_2O の緩和時間を測定することにより、Chappell らは⁶⁴⁾ ラット肝ミトコンドリアの Mn^{2+} 取り込みの研究を行っている。この場合、 Mn^{2+} を加えると直ちに 1H_2O の T_1 が減少し、 Mn^{2+} が膜内に取り込まれるに従い 1H_2O の T_1 が逆に大きくなることがわかった。彼らは種々の条件下における T_1 の時間依存性から、 Mn^{2+} のミトコンドリアへの移行は、リン酸の有無により大きく左右され、リン酸が存在する場合には、medium 中の Mn^{2+} はほとんど全てミトコンドリア内へ取り込まれることを明らかにした。Case ら⁶⁵⁾は同様の方法により更に詳しい研究を行っている。

6. 生体膜系への応用

細胞を intact な状態で 1H NMR を測定すると δ : 4.7~4.9 に細胞水に相当する 1H_2O の大きなシグナルがみられ、脂質やタンパクによるシグナルは殆どみられなくなってしまう。細胞中に含まれる水の状態や結合水

Fig. 9 一酸化炭素処理したウサギ赤血球の ^{31}P NMR (40.5MHz, H_3PO_4 基準)⁸⁰⁾. DPG: 2, 3-diphosphoglycerate, P_i : 無機リン酸. リン酸 (P_i) は膜内側と外側でシグナルが分離している.

の量等の観測には NMR は極めて有効であり、数多くの研究がなされているが⁶⁶⁻⁶⁹⁾、本稿の主題ではないのでここではトピック的なものに限ることにする。

Damadian ら^{70,71)} は、ガン組織の $^1\text{H}_2\text{O}$ の T_1 , T_2 (1~1.4sec 程度) は正常組織 (0.4~1.0sec 程度) に比して異常に大きいことを見出した。その後、腫瘍細胞における水の NMR による研究が精力的に行われている。なぜガン組織の緩和時間に異常性がみられるのかに関してはまだ結論が得られていないが、今後、医学への応用として重要な研究に発展していく可能性がある。

Cerbon⁷²⁾ は、放射菌、恥垢菌をそのまま ^1H NMR で観測すると、水より 3.4~3.7ppm 高磁場側に脂質の側鎖のメチルおよびメチレン基の水素による幅の広いシグナルが観測されることを発見した (Fig. 8)。このシグナルの線幅は pH を 5 から 8.5 に増大させると減少する。これは膜の流動性が増大したことを意味している。Sheetz と Chan は⁷³⁾、赤血球膜の ^1H NMR を測定すると常温ではみることができない膜タンパクと脂質のコリンメチル水素のシグナルが 75°C では観測されることを報告している。これに Mg^{2+} を $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 加える

Fig. 10 数種のリン酸化合物の ^{31}P 化学シフト pH 依存性⁸⁰⁾ (H_3PO_4 基準). F6P: fructose 6-phosphate, CP: carbamylphosphate.

とこれらのシグナルは消失した (線幅が広がり観測できなくなった)。これは、 Mg^{2+} が膜中のタンパクを安定化させてその運動を抑制した結果である。

ミトコンドリアについても、yeast では、高分解のリン脂質側鎖のシグナルが得られることを Brown ら^{74,75)} は報告している。しかし彼らの実験条件では、ミトコンドリアの外膜は破壊されていると考えられ、生理状態でのスペクトルかどうかは大いに疑問がある。また最近、ラット肝ミトコンドリアはその生理的な条件により、タンパクや脂質側鎖のシグナルの線形や強度が著しく変化することや水の状態も変化する (^1H , NMR) ことが見出されている⁷⁶⁾。ミトコンドリアの NMR による分子レベルでの研究も今後の課題である⁷⁷⁻⁷⁹⁾。

最近、更に ^{31}P NMR を用いて (幼若) 赤血球⁸⁰⁻⁸³⁾、血小板⁸²⁾、yeast⁸⁴⁾、筋肉等⁸⁵⁻⁹¹⁾ の細胞ばかりでなく、脳⁹²⁾、心臓等の器官⁹³⁻⁹⁵⁾ のスペクトルが観測されるようになった。

Fig. 9 に一酸化炭素で処理したウサギの赤血球の ^{31}P NMR スペクトル⁸⁰⁾ を示した。無機リン酸によるシグナルが2つに分かれているが、高磁場側が細胞外、低磁場側が細胞内のものである。また無機リン酸や 2, 3-diphosphoglycerate (DPG) の化学シフトは Fig. 10 に示すように pH 依存性があり大きく変化する⁸⁰⁾。これらを利用することにより細胞内の pH を推定することができる。Moon ら⁸⁰⁾ は、この方法より赤血球内部の pH は細胞外に比して 0.16~0.19 ほど高いとの結論を得ている。細胞内の pH 値はこれまで特殊な試薬を用

Fig. 11 カエル排腹筋の ^{31}P NMR⁹¹⁾. (A)カエルを殺したあと15分経過後のスペクトル. (B)(A)に 20mM のカフェインを加え、45分放置後のスペクトル. (C) (A) の積算回数を増やしたもの. PCR: phosphocreatin, Sug-P: sugar phosphate

いてのみしか推定できなかったが、この方法により正確に求められる可能性がある。細胞および細胞内顆粒の膜を介しての pH 差を知ることはいろいろな生理機能を知る上で重要であるので今後の発展が期待されよう⁸⁶⁾。

また、筋肉中のリン酸代謝を研究した例としては、Burt らの仕事⁹¹⁾がある。Fig. 11 A はカエルの腓腹筋の ^{31}P NMR スペクトルである。Fig. 11 B はこの系に 20mM のカフェイン溶液を加えたときの45分後における

Fig. 12 ヒト四頭筋におけるリン酸誘導体濃度の時間変化⁹¹⁾. (A)正常筋, (B)病的状態のもの. T_m : ATP が減少しはじめるまでの時間.

スペクトルである。Aでみられたクレアチンや ATP のシグナルが B では消失し、新しく無機リン酸と sugar phosphate のシグナルがみられる。このヒト筋肉におけるリン酸代謝を追跡したのが Fig. 12 である。これによりクレアチンがまず消費されて次に ATP がなくなっていく過程が手にとるようにわかる。また、正常筋(A)と疾患筋(B)とでは ATP 減少速度が異なることが注目される。

7. おわりに

以上現段階における生体膜に関するいろいろな系での NMR の応用について述べた。この分野における研究例は最近とみに増加しているとはいいいながらも、まだ緒についたばかりであり非常に限られた系にしか用いられていない。それは NMR スペクトルがいろいろな分光法のなかで最もエネルギーの弱い電磁波であるラジオ波によりもたらされたものであるもので、生体膜の研究における多種多様な要求を満たすほどの感度を具えていないからであろう。生体膜系での困難さは、いろいろな物質が幾つもの異なった形で存在し、これらが統一体として機

能していること、ごく微量の物質が大きな生理活性を示し、この過程は単一でないなどという系のもつ複雑さに加えて、膜はいわば準固体状態であるために高分解能のシグナルが得られにくく、しかも得られた情報は系全体の状態の平均として与えられていて、個々の localize したものとしての情報を知ることができないというやや NMR にとって原理的な問題までも考慮しなければならないことである。これらの困難さを克服して近い将来 NMR が生体膜研究の場で真に有効な手段となり得るためには当然のことながら装置の改良、新しい方法の開発等がなされねばならない。

最近開発されつつあるいろいろな方法は上に述べたいくつかの難点を克服するための第一歩として注目されるべきものを含んでいる。それらのいくつかを挙げてみると、一つは、新しい核種として ^{31}P の開発である。 ^{31}P は、①天然に 100% 存在し、相対感度が比較的良好に上、②細胞中には、遊離のリン酸ばかりでなく ATP などのヌクレオチドや DNA, RNA などのポリヌクレオチドが存在し、また生体膜系はリン脂質を構成成分としていること、また、③ ^1H 核の場合のように、水だけが大きな吸収を示し、他の物質は測定困難であるといった測定上の制約も少なく、④細胞などの不均一系でも比較的 T_2 が長く高分解能のシグナルが得られるなどの理由から生体膜の研究には非常に有望な核種である。

また第二は Lauterbur⁹⁶⁾ によって最初に提案された NMR Zeugmatography の手法である⁹⁹⁾。この方法は、外部磁場に勾配を与え、 $^1\text{H}_2\text{O}$ NMR を測定することにより不均一系内部の水の分布状態や運動状態を探ろうというもので、既に生きたマウスの胸腔部断面の像を得ることに成功している⁹⁶⁾。今後この方法がどの程度まで生体膜系へ応用できるか否かは分解能の問題もあり今のところ全く予測できないが、ある成分の局在している状態を知る一つの手がかりとなるかもしれない。

さらに測定装置の進歩に関しては固体状態の高分解能 NMR の開発が挙げられる。上述のように生体膜系における感度の低さは特にその準固体状態に原因があるが、最近、粉末や結晶のリン脂質の ^{31}P NMR スペクトルの測定例が報告されており⁹⁷⁾、今後の発展が期待される。

生体膜およびそのモデル膜を用いた研究は広範囲にわたっているので本稿でその全てをカバーしきれたとはいえない。これまでいくつかの優れた総説^{98~101)}が出されているので不十分な点はこれらを参照して頂きたい。

本稿では NMR の基礎については概説に止めざるを得なかった。化学シフト、線巾等の変化が生体膜系でどのような意味を持つかという、より基礎的な事項については別に記してある¹⁰²⁾ので参考にして頂ければ幸である。

文 献

- 1) 例えば、森島穣、吉川研一：高分子の NMR (II)，第 2 章，化学同人，京都 (1975)
- 2) Farrar, T. C. and E. D. Becker (赤坂一之，井元敏明訳)：パルスおよびフーリエ変換 NMR，吉岡書店，京都 (1976)
- 3) Singer, S. J. and G. L. Nicolson: *Science*, **175**, 720 (1972)
- 4) 野沢義則：生化学，**47**, 521 (1975)
- 5) 大西俊一：蛋白質・核酸・酵素，**17**, 529 (1972)
- 6) Chan, S. I., M. P. Sheetz, C. H. A. Seiter, G. W. Feigenson, M.-C. Hsu, A. Lau and A. Yau: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 499 (1973)
- 7) Finer, E. G.: *J. Mag. Res.*, **13**, 76 (1974)
- 8) Horwitz, A. F., D. Michaelson and M. P. Klein: *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 1 (1973)
- 9) Seiter, C. H. A. and S. I. Chan: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 7541 (1973)
- 10) Lichtenberg, D., N. O. Petersen, J.-L. Girardet, M. Kainosho, P. A. Kroon, C. H. A. Seiter, G. W. Feigenson and S. I. Chan: *Biochim. Biophys. Acta*, **382**, 10 (1975)
- 11) Seelig, J. and A. Seelig: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 406 (1974)
- 12) Seelig, J. and W. Niederberger: *Biochemistry*, **13**, 1585 (1974)
- 13) Seelig, A. and J. Seelig: *Biochemistry*, **13**, 4839 (1974)
- 14) Hauser, H. and M. D. Barratt: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 399 (1973)
- 15) Brunner, J., P. Skrabal and H. Hauser: *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 322 (1976)
- 16) Darke, A., E. G. Finer, A. G. Flook and M. C. Phillips: *J. Mol. Biol.*, **63**, 265 (1972)
- 17) Phillips, M. C. and E. G. Finer: *Biochim. Biophys. Acta*, **356**, 199 (1974)
- 18) Kroon, P. A., M. Kainosho and S. I. Chan: *Nature*, **256**, 582 (1975)
- 19) Butler, K. W., I. C. P. Smith and H. Schneider: *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 514 (1970)
- 20) Kostelnik, R. J. and S. M. Castellano: *J. Mag. Res.*, **9**, 291 (1973)
- 21) Berden, J. A., P. R. Cullis, D. I. Hoult, A. C. McLaughlin, G. K. Radda and R. E. Richards: *FEBS Lett.*, **46**, 55 (1974)
- 22) Berden, J. A., R. W. Barker and G. K. Radda: *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 186 (1975)

- 23) Freychet, P., M. H. Laudat, P. Laudat, G. Rosselin, C. R. Kahn, P. Gordon and J. Roth: *FEBS Lett.*, **25**, 339 (1972)
- 24) Kostelnik, R. J. and S. M. Castellano: *J. Mag. Res.*, **7**, 219 (1972)
- 25) Levine, Y. K., A. G. Lee, N. J. M. Birdsall, J. C. Metcalfe and J. D. Robinson: *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 592 (1973)
- 26) Bystrov, V. F., N. I. Dubrovina, L. I. Barsukov and L. D. Bergelson: *Chem. Phys. Lipids*, **6**, 343 (1971)
- 27) Lawaczek, R., M. Kainosho, J.-L. Girardet and S. I. Chan: *Nature*, **256**, 584 (1975)
- 28) Lawaczek, R., M. Kainosho and S. I. Chan: *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 313 (1976)
- 29) Yeagle, P. L., W. C. Hutton, R. B. Martin, B. Sears and C. Huang: *J. Biol. Chem.*, **251**, 2110 (1976)
- 30) Gent, M. P. N. and J. H. Prestegard: *Biochemistry*, **13**, 4027 (1974)
- 31) De Kruijff, B., P. R. Cullis and G. K. Radda: *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 729 (1976)
- 32) Michaelson, D. M., A. F. Horwitz and M. P. Klein: *Biochemistry*, **13**, 2605 (1974)
- 33) Litman, B. J.: *Biochemistry*, **13**, 2844 (1974)
- 34) Hsu, M. C. and S. I. Chan: *Biochemistry*, **12**, 3872 (1973)
- 35) Chang, C. A. and S. I. Chan: *Biochemistry*, **13**, 4381 (1974)
- 36) Nicolau, C. I., H. Dreeskamp and D. Schulte-Frohlinde: *FEBS Lett.*, **43**, 148 (1974)
- 37) Longe, L., E. K. Ralph and A. G. Redfield: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 891 (1975)
- 38) 寺田弘, 村岡三郎: 蛋白質・核酸・酵素, **18**, 911 (1973)
- 39) Muraoka, S. and H. Terada: *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 271 (1972)
- 40) Terada, H. and K. Yoshikawa: unpublished results.
- 41) Shieh, D. D., I. Ueda, H.-C. Lin and H. Eyring: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **73**, 3999 (1976)
- 42) Fernandez, M. S. and J. Cerbon: *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 8 (1973)
- 43) 福沢健治: ビタミン, **50**, 47 (1976)
- 44) Cushley, R. J. and B. J. Forrest: *Can. J. Chem.*, **55**, 220 (1977)
- 45) Ovchinnikov, Yu. A., V. T. Ivanov and A. M. Shkrob: "Membrane-Active Complexones", Elsevier, Amsterdam (1974)
- 46) Ohnishi, M., M. C. Fedarko, J. D. Baldeschwieler and J. F. Johnson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 312 (1972)
- 47) Kyogoku, Y., M. Ueno, H. Akutsu and Y. Nawata: *Biopolymers*, **14**, 1049 (1975)
- 48) Fernandez, M. S., H. Celis and M. Montal: *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 600 (1973)
- 49) Finer, E. G., H. Hauser and D. Chapman: "Magnetic Resonance in Biological Research" (ed. by C. Franconi) p. 31, Gordon & Breach Science Pub. New York (1971)
- 50) Lau, A. L. Y. and S. I. Chan: *Biochemistry*, **13**, 4942 (1974)
- 51) Lau, A. L. Y. and S. I. Chan: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 2170 (1975)
- 52) Hauser, H., S. A. Penkett and D. Chapman: *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 466 (1969)
- 53) Hammes, G. G. and D. E. Tallman: *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 17 (1971)
- 54) Massari, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 22 (1975)
- 55) Yeagle, P. L., W. C. Hutton and R. B. Martin: *Biochim. Biophys. Acta*, **465**, 173 (1977)
- 56) Cramer, J. A. and J. H. Prestegard: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 295 (1977)
- 57) 赤坂一之: NMR の生化学への応用 (化学増刊 67号), p. 61, 化学同人, 京都 (1976)
- 58) Andrasko, J. and S. Forsen: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 813 (1974)
- 59) Luz, Z. and S. Meiboom: *J. Chem. Phys.*, **40**, 2686 (1964)
- 60) Swift, T. J. and R. E. Connick: *J. Chem. Phys.*, **37**, 307 (1962)
- 61) Haran, N. and M. Shporer: *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 638 (1976)
- 62) Shporer, M. and M. M. Civan: *Biochim. Biophys. Acta*, **385**, 81 (1975)
- 63) Conlon, T. and R. Outhred: *Biochim. Biophys. Acta*, **288**, 354 (1972)
- 64) Chapell, J. B., M. Cohn and G. D. Greville: "Energy-Linked Functions of Mitochondria", p. 219, Academic Press, New York (1963)
- 65) Case, G. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 69 (1975)
- 66) 滝沢俊治: NMR の生体高分子への応用, p. 64, 共立出版, 東京 (1973)
- 67) 林秀和佳: NMR の生体高分子への応用, p. 77, 共立出版, 東京 (1973)
- 68) 上平 恒: 蛋白質・核酸・酵素, **21**, 575 (1976)
- 69) 斎藤 肇: NMR の生化学への応用 (化学増刊 67号), p. 153, 化学同人, 京都 (1976)
- 70) Damadian, R., K. Zanar, D. Hor and T. Dimaio: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **71**, 1471 (1974)
- 71) Damadian, R.: "The Nuclear Resonance Effect in Cancer", Pacific Publishing (1974)
- 72) Cerbon, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 389 (1970)
- 73) Sheetz, M. P. and S. I. Chan: *Biochemistry*, **11**, 548 (1972)
- 74) Brown, L. R., J. H. Bradburg, K. Austin and P. R. Stewart: *J. Membrane Biol.*, **24**, 35 (1975)
- 75) Austin, K., L. R. Brown and P. R. Stewart: *J. Membrane Biol.*, **24**, 55 (1975)

- 76) Yoshikawa, K. and H. Terada: unpublished results.
- 77) Kenough, K. M., E. Oldfield, D. Chapman and P. Beynon: *Chem. Phys. Lipids*, **10**, 37 (1973)
- 78) Arvidson, G., G. Lindblom and T. Drakenberg: *FEBS Lett.*, **54**, 249 (1975)
- 79) Oldfield, E., M. Meadows and M. Glaser: *J. Biol. Chem.*, **251**, 6147(1976)
- 80) Moon, R. B. and J. H. Richards: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7276 (1973)
- 81) Henderson, T. O., A. J. R. Costello and A. Omachi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **71**, 2487 (1974)
- 82) Labotka, R. J., T. Glonek, M. A. Hruby and G. R. Honing: *Biochem. Med.*, **15**, 311 (1976)
- 83) Marshall, W. E., A. J. R. Costello, T. O. Henderson and A. Omachi: *Biochim. Biophys. Acta*, **490**, 290 (1977)
- 84) Salhany, J. M., T. Yamane, R. G. Shulman and S. Ogawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **72**, 4966 (1975)
- 85) Barany, M., K. Barany, C. T. Burt, T. Glonek and T. C. Myers: *J. Supramol. Struct.*, **3**, 125 (1975)
- 86) Burt, C. T., T. Glonek and M. Barany: *J. Biol. Chem.*, **251**, 2584 (1976)
- 87) Hoult, D. F., S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda, R. E. Richards and P. J. Seeley: *Nature*, **252**, 285 (1974)
- 88) Dawson, J., D. G. Gadian and D. R. Wilkie: *J. Physiol.*, **258**, 82p (1976)
- 89) Seeley, P. J., S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda and R. E. Richards: *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 62 (1976)
- 90) Burt, C. T., T. Glonek and M. Barany: *Biochemistry*, **15**, 4850 (1976)
- 91) Burt, C. T., T. Glonek and M. Barany: *Science*, **195**, 145 (1977)
- 92) Zaner, K.S. and R. Damadian: *Science*, **189**, 729 (1975)
- 93) Garbick, P. B., G. K. Radda, P. J. Seeley and B. Chance: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1256 (1977)
- 94) Jacobus, W. E., G. J. Taylor, IV, D. P. Hollis and R. L. Nunnally: *Nature*, **265**, 756 (1977)
- 95) Navon, G., S. Ogawa, R. G. Shulman and T. Yamane: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **74**, 87 (1977)
- 96) Lauterbur, P. C.: *Pure Appl. Chem.*, **40**, 149 (1974)
- 97) Kohler, S. J., and M. P. Klein: *Biochemistry*, **15**, 967 (1976)
- 98) 京極好正：NMR の生体高分子への応用，p. 84，共立出版，東京，(1973)
- 99) 阿久津秀雄，京極好正：生体膜実験法(上) (蛋白質・核酸・酵素別冊)，p. 93，共立出版，東京 (1974)
- 100) 甲斐荘正恒：NMR の生化学への応用 (化学増刊 67号)，p. 137，化学同人，京都 (1976)
- 101) 甲斐荘正恒：生物物理，**16**, 81 (1976)
- 102) 寺田弘，吉川研一：膜学入門 (中垣正幸編)，喜多見書房，東京，(1978)出版予定。

アメリカ化学会における Dynamic Membranes 分科会

アメリカ化学会 (ACS) の第 147 回 National Meeting が 8 月 28 日から 9 月 2 日にかけてシカゴで開かれたが、その第一日目、Division of Industrial and Engineering Chemistry によって dynamic membranes and related topics の session が持たれた。座長は dynamic membrane の創始者で、現在は Union Carbide に移籍した Dr. Marcinkowsky である。表題のせいで Oak Ridge National Laboratory, Union Carbide, Clemson University からの参加者が目立つが、20 人前後の小さなセッションであるのは少し驚いた。セッションは Dr. Marcinkowsky による dynamic membrane 発展の歴史的展望から始まって、次に Weizmann Institute の Dr. Tanny による dynamic membrane をその生成の形式によっていくつかの種類に分けて考える仕事、Weizmann Institute では dynamic membrane の基礎的な研究が進んでいる印象を受けた。大学では Clemson University が dynamic membrane の研究をもっとも活発に行っているが、その成果は同大学の Brandon 教授が 2 報に亘って報告した。

一つは高温における線維工場廃水からの色素の回収で、水、色素、エネルギーを同時に回収することが目的である。次の論文は Zr (IV)-ポリアクリレート膜においてフィード液流速がある値 (これを threshold velocity と呼ぶ) より下であると膜透過速度が激減するという現象を論じたものである。

更に Union Carbide の Bibeau 氏がユカセップによる機械工場からの油水混合廃水の分離の状況についてその実例を示した。廃水は 15 乃至 20 倍に濃縮され 22% の TS レベルに達し、透過水は透明で弗化炭化水素は認められないという。Oak Ridge の Dr. Johnson は dynamic membrane によるクラフトパルプ工場廃水の処理について述べた。hydrous Zr (IV)-Si (IV) oxide によって color rejection は 99 % に達し透過速度は 50~100 g/dft² (220 psi) であるという。session は早めに終了しその後なごやかな懇談の機会を得たのはさいわいであった。なおこれらの論文は Advance in Chemistry Series に収録する話が出ているそうである。(MaG)