生体膜の物質透過に関する基礎的研究—I.

脂質成分再構成膜の水透過性について(1)*

白鳥 昌・水野治夫・武上正典

(1966 年 7 月 14 日受理)

FUNDAMENTAL STUDIES ON THE TRANSPORT OF SUBSTANCES
ACROSS BIOLOGICAL MEMBRANES—I.TRANSPORT OF WATER ACROSS ARTIFICIAL MEMBRANES
RECONSTRUCTED WITH LIPIDS (1)

Masa SHIRATORI, Haruo MIZUNO, and Masanori TAKEGAMI**

The transport of water across artificial membrane reconstructed with lipids such as cephalin- and cholesterol-membrane was measured at different concentrations of salts and acids. The results obtained were as follows:

The transport of water across cephalin- or cholesterol-membrane increases with the increase in the valency of anion in the salt and acid solutions, and decreases inversely with the increase in the valency of cation in these solutions.

When the cephalin-membrane was used, the transport increases at first with increasing concentrations of Na-chloride, Na-glutamate, K-chloride, K-sulfate, K-citrate, hydrochloric acid and sulfuric acid in solution, respectively, until a maximum is reached at definite concentrations, thenceforward, upon further increase of concentration, transport decreases. However, in Mg-chloride or Ca-chloride solution the transport decreases at first with increasing concentrations until a minimum is reached, and upon further increase of concentration, transport increases. In glycine and glutamic acid solutions the transport decreases with increasing concentrations. As for acetic acid solution, as well as sucrose solution, the transport increases with increasing concentrations.

In the case of cholesterol-membrane, the transport decreases with increasing concentrations of Na-chloride, K-chloride, K-sulfate, K-citrate and Mg-chloride solutions, respectively, until a minimum is reached, then, it increases with increasing concentrations.

生物体は多種類の分子を含む多元な溶液相または分散相を、両性イオン交換膜もしくはイオン選択透過膜で細分した組織からなりたっている。したがって生物が代謝を行なう場合も、また生物体を原料として、製造加工を行なう場合でもこの膜を通して物質の移動が行なわれることが考えられる。この見地から、本研究は、透過物質と膜質との相互関係を吟味して、生物体内での物質の移動ならびに加工処理が原料物質に与える影響を明らかにする目的で行なわれたものである。筆者らは、まず生体膜の構成成分中のケファリンとコレステロール膜を通しての水の移動の測定を行ない、結果を得たので報告する。

実 験

試料 実験に用いたケファリン、コレステロールおよびその他の試薬はいずれも市販の特級品で、ケファリンは薄層クロマトグラフィー¹⁾によつて分析した結果、大部分が phosphatidyl-serine で少量の phosphatidyl-choline を含む。

* 本報の要旨は、昭和 41 年 4 月、日本水産学会年会において発表した。

** 東京水産大学 (Tokyo Univ. of Fisheries; Konan, Minato-ku, Tokyo)

Fig. 1. Apparatus for determination of transport of liquid.

phatidyl-ethanolamine と極めてわずかの sphingomyelin を含んでいた。

装置 Fig. 1 に示した。

A は膜を接着するための容器で、B の下部に取りつけるために、図のようにゴムせんがつけてある。B は浸透測定容器で、内径 1 mm、長さ 50 cm の目盛つきの毛細管がついている。A を B に取りつけたときの a 内の容積は約 50 ml である。C は 25°C の恒温水槽である。

膜の作成 脂質膜は、TOBIAS²⁾ らの、りん脂質—コレステロール膜作成方法を取り入れて次のようにして作った。

millipore filter (細孔の直径 $100 \pm 20 \text{ \AA}$ 、厚さ 0.15 mm) をベンゼンで洗じようして、Fig. 1 の A に接着剤で熱して接着し、ケファリンの 1.2~1.5% のベンゼン溶液を膜の両側からしみこませ、引き上げて風乾し、溶媒を完全に蒸発させた。膜の有効面積は約 7 cm^2 であり、膜に吸着したケファリンの量は 1 cm^2 当り 0.8~1.2 mg であった。コレステロール膜も同じようにして作った。

浸透測定法 膜つきのセルを、相対湿度 65% の密閉容器中に 10 時間おき、その後蒸留水中に 12~15 時間浸してから測定溶液に 3 時間以上浸し、つぎにセルを Fig. 1 の B に取りつけ、a 内に測定溶液を満し、コックを閉じて、恒温水槽 C 中の 3 l ビーカーの蒸留水中にコックの下部まで静かに入れて毛細管が垂直に保たれるように固定して、膜を通しての液の浸透を、毛細管中の液の高さの 10 分間の移動によって測定した。

各種の溶液についての測定は、低濃度から高濃度の溶液へと順次行なつたが、溶液の濃度を変える場合には、膜を次に測定しようとする溶液に 30 分間浸し、また溶液の種類を変える場合には、蒸留水中に 12 時間浸してから前述の方法にしたがつて測定した。ただし塩化カルシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム溶液で測定した後で溶液の種類を変える場合には、一度塩化カリウム溶液に浸し、さらに蒸留水に 3 時間つけた後、測定溶液に浸してから測定を行なつた。

結 果

Fig. 2 は 1 価の陰イオンとして塩素イオンを選び陽イオンの種類および荷電数が浸透性におよぼす影響について、Fig. 3 は 1 価の陽イオンに対する陰イオンの種類および荷電数について、Fig. 4 は有機、無機兩種の塩基度の違う酢酸、塩酸、硫酸と、両性電解質であるグリシン、グルタミン酸についての実験の結果を示している。

Fig. 5 はコレステロール膜についての Fig. 2 または Fig. 3 と同様の実験の結果を示している。各図中

Fig. 2. Transport of liquid from the side of water to the side of salt solution through cephalin-membrane.

Fig. 3. Transport of liquid from the side of water to the side of salt solution through cephalin-membrane.

Fig. 4. Transport of liquid from the side of water to the side of acid solution through cephalin-membrane.

Fig. 5. Transport of liquid from the side of water to the side of salt solution through cholesterol-membrane.

には、比較のために中性分子である蔗糖溶液で測定した結果を併記した。本実験では、pH の調整はしなかったが、塩類溶液の pH は 5.0~7.4, 硫酸は 0.2~3.0, 塩酸は 0.9~4.0, 酢酸は 2.4~4.0, グリシンは 6.0~7.0, L-グルタミン酸は 3.3~4.0 の範囲内にあつた。測定中は溶液の攪拌はしなかった。測定温度は 25°C であつた。

脂質を吸着させなかった millipore filter のみの膜では、水の滲透はおこらなかった。

考 察

Fig. 2 をみると 1 価の陰イオン (Cl^-) をもつ塩では、対イオンである陽イオンの荷電数の多い塩溶液ほど浸透性は少なく、 Na^+ や K^+ のような 1 価のイオンの溶液は極大をもつ正の浸透を示し、 Ca^{++} , Mg^{++} のような 2 価のイオンの溶液では逆に極小をもつ負の浸透を示している。このことから、陽イオンの荷電数が増すと浸透性が減少するものと思われる。陽イオンが浸透性に及ぼす強さは正の浸透では、カリウムイオン > ナトリウムイオンで、負の浸透では、カルシウムイオン > マグネシウムイオンである。Fig. 3 の示すところでは、1 価の陽イオンに対して陰イオンの荷電数が大であるほど正の浸透が大となつて極大をもっている。Fig. 2 のアルカリ金属塩と、Fig. 3 のアルカリ金属塩とを比べると、後者の浸透性がより大であつて陰イオンが浸透性に及ぼす強さは、クエン酸イオン > 硫酸イオン > 塩素イオンの順である。硫酸マグネシウム溶液では 2 価の陰イオンの浸透性増加作用を示さず、極小のある曲線形で、他の三者の塩の溶液に比べて、ほとんど浸透性を示していない。Fig. 4 に示されているように、酸の溶液は、塩の溶液に比べて浸透性は少ないが、無機の強酸では、塩と同じように陰イオンの荷電数が大であるほど正の浸透性がより大である。有機の酸では、極大や極小を示す浸透はあらわれず、浸透性も少ない。両性電解質のグリシン（この溶液の pH はほぼ等電点であつた）、グルタミン酸（この溶液の pH は等電点よりややアルカリ側によつていた）も、ほとんど平らな下りこう配の曲線を示して負の浸透性へと傾いてゆくようである。これらの酸の浸透性に及ぼす強さは、硫酸 > 塩酸 > グリシン > グルタミン酸の順である。

Fig. 5 の示すところではコレステロール膜では、陰イオンの荷電数が大になるほど、わずかながら浸透性は増加していて、陰イオンの強さは、クエン酸イオン > 硫酸イオン > 塩素イオンの順である。2 価の陽イオンである Mg^{++} は Na^+ や K^+ のような 1 価の陽イオンより負の浸透力として作用しているようである。この膜では、ケファリン膜と違ってほとんど浸透曲線は極大部を示さず、極小をへて蔗糖溶液に似た傾向がみられる。この蔗糖溶液が示す浸透性のように極大も極小もあらわれずに、濃度差におよそ比例した速さで浸透する場合を正常浸透 (normal Pfeffer-Van't Hoff osmosis)、これに対し上記の各溶液が示す浸透のように比較的稀薄な濃度において多くの場合極大をもつ浸透を異常浸透³⁾ と言われている。コレステロール膜にみられる極小をへてからの上りの部分はおそらく正常の浸透性の部分であろう。

水の異常浸透については、LOEB⁴⁾, SOLLNER⁵⁾ らが、酸化コロディオン膜、コロディオン膜にゼラチン、オキシヘモグロビンなどのたんぱく質を吸着させた膜を用いて、種々の溶液に対する研究をしている。また NEIHOFF⁶⁾ は、ポリスチレンスルホン酸をコロディオン膜につけて同じような実験をしている。

彼らの結果は、膜と同じ符号の荷電数が大なるイオンを含む塩溶液ほど、正の異常浸透性が大であつて、膜と反対の符号の荷電数の大なるイオンを含む塩溶液ほど、正の異常浸透性が小で、ときには負の浸透性を示している。すなわち、膜が陰性荷電を正味の荷電としてもっている場合には、多価の陰イオンをもっている塩ほど、正の異常浸透性が増加し、多価の陽イオンをもっている塩ほど、正の異常浸透性が減少している。本研究の結果と LOEB⁴⁾ らの文献の結果を比べてみるとケファリン膜もコレステロール膜も陰性膜の挙動を示しているものと考えられる。

さらに TOBIAS²⁾ らによつて millipore filter にケファリンを吸着させた膜、コレステロールを吸着させた膜、これらの両者を混合して吸着させた膜の電気抵抗が、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウムのそれぞれの 100 meq/l の溶液中で測定されている。それによると、コレステロールのみの膜では、どの溶液でも 100,000 Ω/cm^2 以上の大なる抵抗を示すが、ケファリンを混合した膜、ケファリンのみの膜では、

塩化カルシウム溶液では、数百 Ω より高い抵抗を示し、塩化カリウム、塩化ナトリウム溶液では数 Ω の抵抗しか示さない。しかしケファリン膜が塩化カルシウム溶液中で示す高い抵抗も pH を小にすると減少する。彼らは、これはケファリンの酸基に結合したカルシウムが水素イオンと置換されたため起こる現象であるとのべている。このことからケファリン分子がもっているりん酸基、カルボキシル基、アミノ基の三つが、溶液中のイオンと相互作用をし、また溶液の pH もその相互作用に深い関係があると考えられている。

本研究に用いた膜は、前に述べたように実験に先だつて、水に十分つけて、細孔内の気体と水とを完全に置き換えたので、細孔内の吸着脂質層内へ浸透した水、または溶液と接した脂質の表面では、脂質固体の相変化、あるいは脂質の分子再配列が瞬間に行なわれて、脂質の親水性基が水と接する側に配向すると考えられる。りん脂質や、せっけんのような極性脂質が、純水中におかれたときには、相⁷⁾の変化、すなわち lyotropic mesomorphism の過程が瞬間におこると言われている。このようなことから、脂質吸着膜でも、前に述べた方位転換する仮定は可能性があると思われる。この変化で脂質膜細孔内で親水基が水の側へ露出するとすれば、ケファリン膜のもつ正味の荷電は、本研究の条件では、正、負、または中性のいずれであろうか。用いたケファリンは、phosphatidyl-serine が主体であるから、その解離した親水基によつて膜の性質が変化するものと考えられる。この脂質は、りん酸基、カルボキシル基、アミノ基の三つの解離基をもっているが、その解離恒数は明らかではないので、いま脂質分子内のりん酸基の解離恒数がりん酸の第1段の解離恒数と同じ値であると仮定し、またカルボキシル基およびアミノ基の解離恒数が、セリンのそれぞれの基の解離恒数と同じ値であると仮定して次の値を用いてケファリンのおよその pK の値を計算すると、このりん脂質の等電点はおよそ 2.1 であることがわかる。

りん酸の第1段解離	$pK_1 = 2.12^{9,10)}$
カルボキシル基の解離	$pK_2 = 2.21^{9,10)}$
アミノ基の解離	$pK_3 = 9.15^{9,10)}$

用いた溶液の pH は、塩酸、硫酸をのぞいては、前に記したように 2.4~7.4 の範囲内であるから、ケファリンはこの pH の範囲では、その等電点のアルカリ側にある。したがつてこれらの溶液と接しているケファリン膜の正味の荷電は負であつて、前記の如く実験結果から推論されたことと一致する。

コレステロールは、イオン性の物質ではないので、溶液に対する膜荷電の影響は少なく、膜抵抗が大であることから、イオンの透過性もよくないと考えられる。しかしこの膜でも、電解質に接すると、いくらか異常浸透性を示し、蔗糖溶液の場合と違っていることから、分子内の水酸基が溶液中のイオンに作用を及ぼすのではないかと思われる。

LOEB⁴⁾ の測定によつて、異常浸透は膜の濃淡電位と、膜細孔内表面の動電位の両者におよそ比例すると述べられているが、脂質膜の場合においても膜電位および膜細孔内の動電位の測定は、この膜の異常浸透現象の解明の手がかりになるものと思われる。また、複合膜、および混合溶液に関する異常浸透現象の検討は今後の問題であろう。

要 約

種々の電解質溶液を用いて種々の濃度にわたつて、ケファリン、コレステロール膜の水の浸透性を毛管圧力計の毛細管内の水面の 10 分間の移動を測定することによつて調べた。

ケファリンおよび、コレステロール膜はともに、水の透過は溶液中の陰イオンの荷電数が増加するにしたがつて増加し、陽イオンの荷電数が増加するにしたがつて逆に減少した。

ケファリン膜では、1 価の陽イオンである Na^+ , K^+ , H^+ をもつ塩、および無機の酸は正の極大をもつ浸透を示し、2 価の陽イオンである Mg^{++} , Ca^{++} を含む塩類では極小をもつ浸透を示した。ただし酢酸と、両性電解質であるグリシン、グルタミン酸は共に極大も極小も示さなかつた。

コレステロール膜では用いた全ての溶液は極小をへてから蔗糖溶液の浸透と似た傾向を示した。

これらのことから、ケファリン膜も、コレステロール膜も陰性膜であることがわかつた。

終わりに、本研究に種々ご便宜とご助力を下さった東京水産大学安藤一夫助教授に対し深謝の意を表します。

文 献

- 1) V. P. SKIPSKI, R. F. PETERSON, and M. BACLAY: *J. Lipid Res.*, **3**, 467~470 (1962).
- 2) J. M. TOBIAS, D. P. AGIN, and R. PAWLOWSKI: *J. Gen. physiol.*, **45**, 989~990 (1960).
- 3) E. GRIN and K. SOLLNER: *J. Gen. physiol.*, **40**, 887 (1957).
- 4) J. LOEB: *J. Gen. physiol.*, **4**, 463~468, 621~627 (1922).
- 5) E. GRIN and K. SOLLNER: *J. Gen. physiol.*, **40**, 887~899 (1957).
- 6) R. NEIHOF: *J. Phys. Chem.*, **58**, 919~920 (1954).
- 7) R. PAOLETTI and D. KRITCHEVSKY: "Advances in Lipid Research", Vol. I, 68~69, Academic Press, New York (1963).
- 8) 日本化学会編: 化学便覧 621, 丸善 (1952).
- 9) 水島三一郎・赤堀四郎編: "蛋白質化学" Vol. 2, 222, 共立出版社 (1954).
- 10) LANDOLT BÖRNSTEIN: "Physikalisch-Chemische Tabellen", 6 Auflage, 918 (1960).