多相共存単分子膜中における脂質分布に及ぼす Poly(γ -methyl L-glutamate) の影響

中垣正幸,^{1a)} 市橋宏明*,^{1b)}

京都大学薬学部

Effect of Poly(γ -methyl L-glutamate) on Distribution of Lipids in Monolayers Composed of Multiphases

MASAYUKI NAKAGAKI^{1a)} and HIROAKI ICHIHASHI*,^{1b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida,
Shimoadachi-cho, 46-29, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan

(Received February 2, 1987)

Poly(γ -methyl L-glutamate) (PMLG) was added to mixtures of triolein (TO) and L- α -dilauroylphosphatidylcholine (DLPC). The mixtures were spread as insoluble monolayers at an air-water interface. PMLG caused phase separation in the monolayers and formed duplex films where PMLG was situated under polar groups of the lipid monolayers. In the mixed monolayers four transitions (a collapse of the lipid monolayer, a bilayer formation from PMLG monolayer, a formation of the duplex film and a transition of the duplex film) were observed and multiphases equilibria were found. From collapse pressures of lipid monolayers and formation pressures of the duplex films, lipid compositions in the lipid phases were estimated, and it was found that an increase in PMLG amount resulted in a decrease in TO concentration in the lipid phase being in equilibrium with the polymer phase or the duplex film. It was shown that PMLG caused unequal distribution of the lipids in the mixed monolayers.

Keywords—poly(γ -methyl L-glutamate); triolein; phosphatidylcholine; monolayer; mixed monolayer; phase separation; partition

Poly(γ -methyl L-glutamate) (PMLG) はヘリックス溶媒中では棒状分子となり、リオトロピックな液晶を作る物質として知られている。²⁾ 軸比の大きい棒状分子の溶液は相分離を起こし易い。³⁾ ことが知られており、我々は PMLG と脂質の混合単分子膜でもいくつかの脂質について Fig. 1 a に示すように脂質相 (L 相) と PMLG 相 (P 相) に相分離が起こることを見出した。^{4,5)} また脂質との混合単分子膜中では Fig. 1 b に示すように脂質単分子膜の下に PMLG の付着した二重膜 (LP 相) が形成された。二重膜の形成される表面圧は PMLG と脂質の極性基の親和性に影響される。Triolein(TO), dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) はそれぞれ二重膜が 7 及び 39 mN $\cdot$ m⁻¹ で形成され、PMLG との親和性が異なる。そこで本研究ではこれら 2 種類の脂質を含む系における二重膜形成に及ぼす脂質組成の影響を検討した。

つぎに PMLG と脂質の混合膜では Fig. 1 に示すように L 相-P 相, L 相-LP 相の共存系が出現する。脂質は L 相及び LP 相ばかりでなく P 相にも存在するため 2 種の脂質が存在する場合 PMLG と親和性の強い脂質は PMLG の存在する P 相及び LP 相に多く分布すると予想される。生体膜中の脂質分布が膜タンパク質によって片寄る⁶⁻⁹⁾ ことが報告され

Fig. 1. Schemata for Phase Equilibria Appeared in the Mixed Monolayers of PMLG and Lipids
(a), L phase-P phase; (b), L phase-LP phase.

ていることからポリアミノ酸による脂質単分子膜中の脂質分布の変化に関する研究は興味をもたれる。そこで Fig. 1 に示す二相共存系における脂質分布に及ぼす PMLG の影響について研究した。

実験の部

試料 PMLG (味の素株式会社) は前報と同様に分画し分子量 10 万のものをを用いた。⁴⁾ DLPC は Calbiochem-Behling Co., Ltd., TO は Sigma 製を使用した。

表面圧の測定 表面圧 (F)-面積 (A) 曲線は Cenco 社製の水平型表面天秤を用い測定した。PMLG はジクロロ酢酸、脂質はクロロホルムに溶解しいずれの溶液も -25°C の冷凍庫に保存し展開する直前に両者を混合した。展開溶液中のクロロホルムとジクロロ酢酸の比はクロロホルム又はジクロロ酢酸を追加して常に 19:1 にした。溶液は Agla 社製マイクロメーターシリンジを用い水面に滴下し 10 分間放置した後圧縮を開始した。それぞれ圧縮後 2 分経過後表面圧を測定した。水槽の温度はガラス製曲管を沈め 25°C に調節した。

組成の表現法及び平均面積の計算法 モル-残基分率は次の式で定義した。

$$N_L = N_1 + N_2, \quad N_T = N_1 + N_2 + N_P \quad (1)$$

$$x_1 = N_1/N_L, \quad x_2 = N_2/N_L \quad (2)$$

$$y_1 = N_1/N_T, \quad y_2 = N_2/N_T, \quad y_P = N_P/N_T, \quad y_L = N_L/N_T \quad (3)$$

ここで下添え字 1, 2, P, L はそれぞれ DLPC, TO, PMLG, 脂質を表し, x_i, y_i は全脂質の中の脂質 i のモル分率及び成分 i の系全体に対するモル-残基分率, N_i は脂質については分子数, PMLG についてはアミノ酸残基数である。

平均面積 (A) は次式によって計算した。

$$A = A_T/N_T \quad (4)$$

ただし A_T は膜に覆われた面積である。

結 果

1. 混合膜にみられる転移

脂質組成一定で PMLG と脂質との混合比を変えた場合の F - A 曲線を Fig. 2 に示す。単分子膜中の転移は F - A 曲線に屈折点として観察される。Fig. 2a は TO と PMLG との混合膜であるが TO の F - A 曲線は $12.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ に崩壊¹⁰⁾による水平部が現れている。PMLG の F - A 曲線には PMLG の単分子膜から二分子膜への転移¹¹⁾が $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ にみられた。本実験の条件では PMLG は α -ヘリックスをしている。⁴⁾ ここに示した組成では PMLG と脂質は Fig. 1a に示すように PMLG 相 (P 相) と脂質相 (L 相) に分離が起こる。⁴⁾ 混合膜では $7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ に二重膜 (LP 相) の形成による屈折点が見られた。二重膜の構造は Fig. 1b に示したように脂質膜の極性基に PMLG が付着した構造である。⁵⁾ $23.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ の転移は二重膜中の PMLG の二分子層への変化による。⁴⁾ このように PMLG と TO との混合膜では 4 種の転移が見られる。それは表面圧の低いほうから二重膜の形成 (P 相+L 相→LP 相), 脂質膜の崩壊 (L 相→l 相, ここで l 相は脂質の崩壊相を表す), PMLG の二分子膜転移 (P 相→PP 相, ここで PP 相は PMLG の二分子膜を表す), 二重膜の転移 (LP 相→LPP 相+l 相, ここで LPP 相は脂質膜の下に PMLG の二分子膜が付着した二重膜を表す) である。これらの転移の起こる表面圧をそれぞれ二重膜形成圧 (F_d), 脂質膜の崩壊圧 (F_e), PMLG の二分子膜形成圧 (F_b), 二重膜の転移圧 (F_{de}) と呼ぶことにする。

2. 混合膜にみられる相分離と多相共存

表面相の相律によれば、表面に存在している相の数と自由度は関連しているため、自由度から表面に存在する相の数が求まる場合がある。二成分系では表面に三相が共存する時自由度は 0 となり¹²⁾ 共存する相の組成、表面圧は一定値をとる。TO-PMLG 系では Fig. 3 に示すように上に述べた 4 つの転移の起こる表面圧は組成に依存しないため表面に三相が共存していることを示している。共存している相は、 F_d において P, L, LP 相, F_e において L, LP, l 相, F_b において P, LP, PP 相, F_{de} において LP, LPP, l 相である。

DLPC-TO 混合単分子膜では単分子膜の崩壊のみ観察される。TO 単分子膜では崩壊は一定表面圧で起こり崩

Fig. 2. Surface Pressure (F)–Mean Area (A) Curves of Mixed Monolayers of PMLG, Triolein and DLPC with Various Residual Fraction of PMLG (y_P) and Constant Mole Fraction of Triolein (x_2)

x_2 : (a) 1.0; (b) 0.75; (c) 0.5; (d) 0.

y_P : (a) $\odot$, 1.0; $\ominus$, 0.92; $\oplus$, 0.84; $\bullet$, 0.78; $\circ$, 0.58; $\ominus$, 0.41; $\bullet$, 0.19; $\circ$, 0.
 (b) $\odot$, 1.0; $\ominus$, 0.95; $\bullet$, 0.90; $\circ$, 0.80; $\bullet$, 0.70; $\circ$, 0.60; $\bullet$, 0.40; $\circ$, 0.20; $\circ$, 0.
 (c) $\odot$, 1.0; $\bullet$, 0.90; $\ominus$, 0.80; $\bullet$, 0.70; $\bullet$, 0.60; $\circ$, 0.40; $\bullet$, 0.20; $\circ$, 0.
 (d) $\bullet$, 1.0; $\odot$, 0.90; $\circ$, 0.80; $\bullet$, 0.60; $\ominus$, 0.40; $\bullet$, 0.20; $\circ$, 0.

壊後は膜を圧縮しても表面圧は変化しなかったが、DLPC との混合膜では、Fig. 2 b, c に示すように崩壊後は圧縮により表面圧は増加した。DLPC-TO 混合単分子膜の崩壊圧と x_2 の関係は Fig. 4 に $\bullet$ 印で示すように F_c は x_2 の減少に伴い増加した。このことは崩壊相が存在する時、自由度が 1 つ残っており、表面は二相共存状態であることを表している。つまり単分子膜中では DLPC と TO が混合していることを示している。¹⁸⁾

三成分系の場合、表面に四相が共存するとき自由度は 0 になる。三成分系では、上に述べた 4 種の転移は Fig. 2 b, c に示すように屈折点として観測された。 F_d 及び F_e は TO-PMLG の二成分系の場合 y_P に依存しなかったが三成分の場合 y_P によって変わり、PMLG 量の影響が現れてきた。しかし F_b 及び F_{dc} は y_P , x_2 に依らず一定となっていた。このことは F_d 及び F_e では自由度が 1 残っており表面に三相が共存しているが、 F_b 及び F_{dc} においては自由度がなく四相共存状態となっていることを意味している。共存する四相は、 F_b で P, L, LP, PP 相、 F_{dc} で L, LP, LPP, 一相である。

このように DLPC-TO-PMLG 系では表面において、二相、三相及び四相の多相共存状態が出現することが明らかとなった。

3. LP 相の形成と L 相-P 相間の脂質の分配

PMLG と脂質の混合膜中では低い表面圧では Fig. 1 a に示すように P 相、L 相に分離している。⁴⁾ 二重膜は P 相と L 相が共存するとき Fig. 1 b に示すように L 相の下に P 相が入り込む形で形成される。

TO-PMLG 系、DLPC-PMLG 系の二重膜形成はそれぞれ 7, 39 mN·m⁻¹ で起こる。二重膜の形成圧は Fig. 3 及び 4 に示すように脂質組成と PMLG 量の影響を受けるが、脂質組成の影響が大きく現れた。 F_d が脂質組成の影響が大きい理由は F_d がおもに PMLG と脂質の極性基間の付着仕事で決まるためと考えられる。⁵⁾

P 相+L 相→LP 相の変化は TO-PMLG 系では三相共存状態になるため一定の表面圧で起こり、膜を圧縮しても L 相又は P 相のいずれかが消失するまで表面圧は変わらない。しかし 2 種の脂質を含む場合、三相共存系

Fig. 3. Effect of PMLG Amount on the Various Transition Pressures of the Mixed Monolayers with Lipid Composition of (○) $x_2=1.0$, (◐) 0.75 and (●) 0.50

Transition: —, formation of the duplex film (F_d); ---, collapse of the L phase (F_c); —, formation of bilayer from the P phase (F_b); —, transition of the duplex film (F_{de}).

Fig. 4. Effect of Lipid Composition (x_2) on the Various Transition Pressures of the Mixed Monolayers with Fixed (◐) $y_P=0$, (◑, ◒, ◓, ◔) 0.4, and (○, ◐, ◑, ◒) 0.8

Transition: ○, ◐, ◑, formation of the duplex film (F_d); ◐, ◑, ◒, ◓, ◔, collapse of the L phase (F_c); ◑, ◒, ◓, ◔, formation of bilayer from the P phase (F_b); ◐, ◑, transition of the duplex film (F_{de}).

Fig. 5. Change of TO Concentration in L Phase (x_2^L) with PMLG Amount at (a) Formation Point of the Duplex Film and (b) Collapse Point of the L Phase

でも自由度が1つ残るので、LP相の形成が進むにつれて、L相、P相及びLP相中の組成が変わり、表面圧も変化する。事実 Fig. 3 及び 4 に示すように F_d は y_P 及び x_2 の影響を受ける。三成分系の場合、表面に二相が共存するとき自由度は2であるから、共存する相の組成は、表面圧の他 y_P 又は x_2 によって変化する。したがってP相とL相が共存している時、L相中の脂質組成は y_P によって変化する。Fig. 3 に示すように y_P が小さくなると F_d が一定値に漸近しているが、これはPMLGが少なくなるとP相及びL相中の脂質組成が一定してくるためである。この漸近値は Fig. 4 に示した $y_P=0.4$ の F_d - x_2 曲線とほぼ一致した。したがってこの曲線は二重膜が形成される時のL相の脂質組成を表わすと考えられる。

y_P が大きいほど F_d への影響が顕著になる理由は、PMLG が多いと P 相に溶け込む脂質が多くなる結果 L 相の脂質組成の変化が大きくなるためと考えられる。そこで P 相-L 相共存下における L 相中の脂質組成に及ぼす PMLG の効果を調べるために、Fig. 3 に示した $x_2=0.75$ 及び 0.5 のときの F_d - y_L プロットの各点について F_d に対応する L 相中の TO 組成 (x_2^L) を Fig. 4 に示した $y_P=0.4$ の F_d - x_2 曲線から読み取った。 x_2^L - y_P の関係を Fig. 5 a に示す。 x_2^L は y_P の増加に伴い減少しており、PMLG によって脂質分布が変化することを示している。TO は DLPC より P 相に取り込まれ易いことから、TO は単分子膜中では DLPC より PMLG と親和性が強いと結論される。

4. L 相の崩壊と L 相-LP 相間の脂質の分配

この実験で用いた組成では、脂質が多いために二重膜が形成された後は Fig. 1 b に示す LP 相と L 相の二相共存系になる。したがって L 相と LP 相の組成は表面圧と y_P 又は x_2 によって変化する。Fig. 3 に示すように y_P が小さくなると F_c は一定値に漸近したが、これは PMLG が少なくなると P 相及び LP 相中の脂質組成の変化が少なくなるためである。この漸近値は Fig. 4 に示した $y_P=0$ の F_c - x_2 曲線と一致した。PMLG-TO 系では PMLG は L 相中にほとんど溶けない。⁴⁾ したがって F_c は事実上 L 相中の脂質組成のみで決まると考えられる。

Fig. 4 に示すように y_P が大きくなる (y_L が小さくなる) と F_c が増加する理由は、PMLG が増えると LP 相中の脂質が多くなる結果 L 相の脂質組成の変化が大きくなるためと考えられる。そこで P 相-LP 相共存下における L 相中の脂質組成 (x_2^L) に及ぼす PMLG の効果を調べるために、Fig. 3 に示した $x_2=0.75$ 及び 0.5 のときの F_c - y_L プロットの各点について F_c に対応する L 相中の TO 組成 (x_2^L) を Fig. 4 に示した $y_P=0$ の F_c - x_2 曲線から読み取った。 x_2^L - y_P の関係を Fig. 5 b に示す。 x_2^L は y_P の増加に伴い減少しており、L 相と LP 相との間でも脂質分布が PMLG 量によって変化することを示している。

考 察

1. 二重膜中の脂質組成

表面に L 相と LP 相の共存しているとき L 相の組成は F_c - x_2 の関係から求めることができるが、LP 相の組成は直接求めることはできない。そこで LP 相中の脂質組成を幾つかの仮定を設けて計算によって求めた。ただし計算に際して (1) PMLG はすべて LP 相に存在する、(2) 脂質及び PMLG の占有面積は P 相, L 相, LP 相のいずれでもそれぞれ同じ表面圧における蒸留水上の純成分の分子又は残基占有面積に等しいと仮定した。(1) については L 相中の PMLG 面積分率は TO-PMLG 系で 0.04 にすぎないことから、L 相中の PMLG を無視して良いと考えられる。(2) については LP 相が形成された後は表面積が脂質の面積と一致することから妥当と考えられる。⁵⁾

計算手順を簡単に示す。相 α 中の脂質 i のモル数、モル分率をそれぞれ N_i^α , x_i^α 、蒸留水上の脂質の分子面積及び PMLG の残基面積をそれぞれ A_i , A_P とすると、LP 相を形成している PMLG と脂質の面積が等しいことから、

$$A_1(N_1 - N_1^L) + A_2(N_2 - N_2^L) = A_P N_P \quad (5)$$

の関係が導かれる。更に全 TO 分子のうちで L 相に存在する TO 分子の割合を $\xi (=N_2^L/N_2)$ で表し、式 (5) から N_1 , N_2 , N_1^L , N_2^L を消去すると

$$\xi = \frac{x_2^L [A_1(1-x_2) + A_2x_2 - A_P y_P / (1-y_P)]}{x_2 [A_1(1-x_2^L) + A_2x_2^L]} \quad (6)$$

が得られる。また LP 相中の TO のモル分率 x_2^{LP} は

$$x_2^{LP} = \frac{1-\xi}{1/x_2 - \xi/x_2^L} \quad (7)$$

で与えられる。したがって、全体の組成 x_2 , y_P 及び x_2^L が分かっている場合 x_2^{LP} が求まる。

$y_P=0.75$ 及び 0.5 のときの混合膜について Fig. 5 に示した x_2^L を用いて式 (6) 及び (7) によって x_2^{LP} を求めた。Fig. 6 に x_2^L - x_2^{LP} の関係を示す。TO は L 相中より LP 相中の濃度が高くなっていることが分かる。

F_d は脂質の極性基の種類による影響が大きい。これは二重膜が脂質の極性基に PMLG が付着した構造をとっているため、LP 相を形成する脂質の極性基と PMLG の付着仕事が多いほうが二重膜の形成仕事小さくなることと関係している。⁵⁾ TO と PMLG の付着仕事は DLPC と PMLG の間の付着仕事に比べて大きいため、LP 相中の TO 量が減少すると付着仕事が低下するので F_d は増加すると考えられる。

Fig. 4 に示すように x_2 が大きいとき F_d の変化が小さい理由を考察する。脂質は L 相と LP 相に不均一に分布するため、系全体の脂質組成が LP 相の脂質組成を表すとは限らない。 x_2 と F_d の関係は Fig. 4 に示してあるが、LP 相中の脂質組成は Fig. 4 に示した x_2 より大きい値であることを Fig. 6 は示している。 $y_p=0.4$ のとき x_2 が 1 から 0.5 に減少しても F_d はわずかに $3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ しか増加しない。

Fig. 6 によれば x_2^L が 1 から 0.5 まで変化しても x_2^{LP} は 0.8 までしか低下せず、 x_2^{LP} の変化は小さいことを示しており、 F_d の変化が小さい理由と考えられる。

2. L 相と LP 相の間の脂質の分配

二相間の物質分布を表すために通常分配係数が用いられる。そこで L 相と LP 相の間の脂質の分配挙動を分配係数 K を用いて検討した。希薄溶液の場合は二相間の溶質の濃度比で定義される分配係数がもちいられるが、本実験では TO と DLPC について溶質と溶媒の区別がないこと、及び LP 相の大きさが限定されていることから通常の分配係数を用いることができない。そこでまずこの系における分配係数を初めに示すことにする。

表面圧 F における L 相と LP 相の間の脂質の分配を考えると、LP 相の面積は PMLG 量によって決まるため脂質組成が変わっても一定と考えられる。したがって DLPC の n_1 分子が L 相から LP 相へ移るとき、TO は n_2 分子が LP 相から L 相へ移らなければならない。したがってこのときの自由エネルギー変化 (ΔG) は次式で与えられる。

$$\Delta G = n_1(\mu_1^{LP} - \mu_1^L) + n_2(\mu_2^L - \mu_2^{LP}) \quad (8)$$

ここで μ_i^α は成分 i の相 α における化学ポテンシャルである。 μ_i^α は一定表面圧においては bulk 相と同様に、

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^{\alpha 0} + RT \ln a_i^\alpha \quad (9)$$

と表すことができる。ここで a_i^α は相 α 中の成分 i の活量、 $\mu_i^{\alpha 0}$ は表面圧 F における標準化学ポテンシャルである。平衡状態では $\Delta G = 0$ が成立する。更に移動した TO と DLPC の面積は等しいことから n_1 と n_2 の間には

$$A_1 n_1 = A_2 n_2 \quad (10)$$

の関係がある。したがって

$$K = (a_2^{LP}/a_2^L)^\lambda a_1^L/a_1^{LP} \quad (11)$$

で定義される分配係数は、式 (8)–(11) から

$$K = \exp \{ -[\lambda(\mu_2^{LP0} - \mu_2^{L0}) - (\mu_1^{LP0} - \mu_1^{L0})]/RT \} \quad (12)$$

であり定数となる。ここで $\lambda = A_1/A_2$ である。 λ を TO 及び DLPC の F - A 曲線から計算すると、表面圧 5–30 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ の範囲で 0.6 から 0.7 の値であり、ほぼ DLPC と TO の脂肪酸残基数の比 2/3 になっていた。

Fig. 6 に活量をモル分率で置き換え $\lambda = 2/3$ として

Fig. 6. Partition of TO and DLPC between L and LP Phase

Dotted curves are x_2^{LP} - x_2^L relations calculated by using the equation: $K = (x_2^{LP}/x_2^L)^{2/3} (1 - x_2^L)/(1 - x_2^{LP})$ for various K .

$$K = (x_2^{LP}/x_2^L)^{2/3} \cdot (1 - x_2^L)/(1 - x_2^{LP}) \quad (13)$$

によって様々な K の値について求めた x_2^L と x_2^{LP} の関係を破線で示した. 実験値は x_2^L が大きい時には $K=7$ に, x_2^L が小さくなると $K=4$ に近い値となった. つまり TO が L 相から LP 相に分配され易い傾向は x_2 が大きい方が強いことを表している.

Hamilton は TO と卵黄レシチンのリポゾームの ^{13}C -NMR を測定し, TO のカルボニルの化学シフトがレシチンのカルボニルの化学シフトに比べてシフト試薬の影響を受けにくいことから TO のカルボニルはレシチンのカルボニルに比べ脂肪酸鎖側に位置していると報告している.¹⁴⁾ このことから LP 相中での TO の極性基と PMLG との接触は脂質膜が圧縮されるほど, また DLPC が多いほど妨げられると考えられるため x_2 の小さいとき PMLG と TO との相互作用が弱められる結果 K が小さくなると考えられる.

K が 1 より大きいときは x_2^L が小さい時に x_2^{LP} の変化が大きい. 例えば $K=4$ の場合 x_2^L が 0.2 から 0 まで変化するとき x_2^{LP} は 0.57 から 0 まで変化する. Fig. 4 に示すように x_2 が小さいとき F_d の変化が大きい理由は, x_2^L が小さいとき LP 相中の脂質組成の変化が大きいことによる.

本実験に用いた脂質の DLPC はりん酸基とコリン基を持つが正味電荷は 0 であり, TO と PMLG は荷電基を持たないため解離基同志の静電的相互作用はない. 脂質の極性基と PMLG の間の分子間力は, TO と PMLG の間はエステル部同志の双極子間相互作用のように弱い相互作用であり, DLPC-PMLG 間はいん酸コリン基の水和が強く PMLG はりん酸コリン基に近づけず相互作用は弱いと推定されている. このように本実験の結果は弱い相互作用でも脂質の分布に変化が生ずることを示している.

以上より TO と DLPC は PMLG に対する親和性が異なるため L 相-P 相又は L 相-LP 相の間の分布に片寄りが生ずることが明らかとなった.

引用文献及び注

- 1) 現住所: a) 星薬科大学, 東京都品川区荏原 2-4-41; b) 大日本製薬製品研究所, 大阪府吹田市江の木町 33-94.
- 2) 中島章夫, “高分子の分子物性,” 中島章夫, 細野正夫編, 化学同人, 京都, 1969, p. 25.
- 3) P. J. Flory, *Proc. Roy. Soc.*, **A234**, 73 (1956).
- 4) M. Nakagaki, H. Ichihashi, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1715 (1987).
- 5) 中垣正幸, 市橋宏明, 薬誌, **107**, 570 (1987).
- 6) P. C. Jost, O. H. Griffith, R. A. Capaldi, G. Vanderkooi, *Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A.*, **70**, 480 (1973).
- 7) P. F. Knowles, A. Watts, D. Marsh, *Biochemistry*, **20**, 5888 (1981).
- 8) J. F. Ellena, M. A. Blazing, M. G. McNamee, *Biochemistry*, **22**, 5523 (1983).
- 9) G. B. Birrell, O. H. Griffith, *Biochemistry*, **15**, 2925 (1972).
- 10) M. Nakagaki, N. Funasaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 2482 (1974).
- 11) B. R. Malcolm, *Proc. Roy. Soc.*, **A305**, 363 (1968).
- 12) R. Defay, I. Prigogine, “Surface Tension and Adsorption,” Longmans, Green & Co. Ltd., London, 1966, p. 71.
- 13) 舟崎紀昭, “生体表面,” 中垣正幸, 岩田修三編, 南江堂, 東京, 1975, p. 32.
- 14) J. A. Hamilton, D. M. Small, *Proc. Acad. Soc. U.S.A.*, **78**, 6878 (1981).