

主論文

理
276 函
1-3

---

學位申請論文 (正°一)

---

---

大木和夫

---

学位論文

「磷脂質モデル膜内でのポリエー系抗生  
物質とステロールの相互作用」

大木和夫

この学位論文の基礎となる論文

1. INTERACTION OF POLYENE ANTIBIOTICS WITH STEROLS IN PHOSPHATIDYLCHOLINE BILAYER MEMBRANES AS STUDIED BY EPIANDROSTERONE SPIN PROBE

KAZUO OHKI, YOSHINORI NOZAWA and SHUN-ICHI OHNISHI  
Biochimica et Biophysica Acta (投稿中)

2. STUDIES ON TETRAHYMENA MEMBRANES: TEMPERATURE-INDUCED ALTERATIONS IN FATTY ACID COMPOSITION OF VARIOUS MEMBRANE FRACTIONS IN TETRAHYMENA PYRIFORMIS AND ITS EFFECT ON MEMBRANE FLUIDITY AS INFERRED BY SPIN-LABEL STUDY

Y. NOZAWA, H. IIDA, H. FUKUSHIMA, K. OHKI and S. OHNISHI  
Biochimica et Biophysica Acta, 367, 134-147 1974

# 目次

要約	1
略語表	3
序論	5
材料と方法	12
a. ポリエン系抗生物質	12
b. 磷脂質	13
c. ステロール	14
d. スピンラベル試薬	15
e. リポゾームとヴェツワルの 調製	17
f. 脂質二重層の相転移と流動 性の測定	19
g. 培養温度を変えたテトラヒ メナ細胞の膜分画の脂肪酸 組成と流動性の測定	20
h. ポリエン系抗生物質の作用 の測定	21
i. ESRスペクトルの測定	26

<ul style="list-style-type: none"> <li>j. ポリエン系抗生物質の吸収</li> <li>    スペクトルの測定</li> </ul>	26
---	----

結果	28
----	----

<ul style="list-style-type: none"> <li>1. 脂質二重層の相転移と流動性</li> </ul>	28
--	----

<ul style="list-style-type: none"> <li> <ul style="list-style-type: none"> <li>1a) 相転移</li> </ul> </li> </ul>	28
---	----

<ul style="list-style-type: none"> <li> <ul style="list-style-type: none"> <li>1b) 流動性</li> </ul> </li> </ul>	30
---	----

<ul style="list-style-type: none"> <li> <ul style="list-style-type: none"> <li>1c) 超音波処理の効果</li> </ul> </li> </ul>	34
--	----

<ul style="list-style-type: none"> <li> <ul style="list-style-type: none"> <li>1d) 脂質組成と、相転移または流動性</li> </ul> </li> </ul>	35
---	----

<ul style="list-style-type: none"> <li> <ul style="list-style-type: none"> <li>1e) ステロール類似ラベルの脂質二重層内での運動</li> </ul> </li> </ul>	38
---	----

<ul style="list-style-type: none"> <li>2. 脂質二重層に対するコレステロールの効果</li> </ul>	42
--	----

<ul style="list-style-type: none"> <li>3. ポリエン系抗生物質によるゲツワルの融合</li> </ul>	44
--	----

<ul style="list-style-type: none"> <li>4. ポリエン系抗生物質とステロイドスピンプローブとの相互作用</li> </ul>	47
---	----

<ul style="list-style-type: none"> <li>5. 脂質二重層に対するコレス</li> </ul>	47
---	----

	テロール効果とポリエン系 抗生物質の作用	50
6.	ポリエン系抗生物質とステ ロールの脂質二重層内での 結合定数	51
7.	ポリエン系抗生物質のステ ロールとの相互作用による 吸収スペクトルの変化	56
8.	ポリエン系抗生物質で処理 された DEPC が ゼツクル中の EASP の ESR スペクトルの温 度変化	56
9.	ポリエン系抗生物質と相互 作用している成分の定量化 とその温度変化	58
10.	ポリエン系抗生物質で処理 した DEPC の ゼツクル中の EASP の最大分離幅の温度変 化	60
	考察	61

謝辭	71
參考文獻	72
圖表	79
圖 1	79
圖 2	80
圖 3	81
圖 4	82
圖 5	83
表 1	84
圖 6	85
圖 7	86
圖 8	87
圖 9	88
圖 10	89
圖 11	90
圖 12	91
圖 13	92
圖 14	93
圖 15	94
圖 16	95

图 17	96
图 18	97
图 19	98
表 2	99
图 20	100
表 3	101
图 21	102
图 22	103
图 23	104
图 24	105
图 25	106
图 26	107



## 要約

フオスファチガルコリンの二重層膜での、  
フィリピンまたはアンフォテリシンBとステ  
ロールの相互作用をステロイドスピンプロー  
ブまたはフオスファチガルコリンスピンプロ  
ーブを用いて調べた。ステロイドスピンプ  
ローブのESRスペクトルはポリエニ系抗生  
物質と結合している成分と結合してゐない成  
分よりなり、これらの成分を定量すること  
でポリエニ系抗生物質とステロール(ステロイ  
ドスピンプローブを含む)の結合定数を求め  
た。ガエライドイルフオスファチガルコリ  
ン膜内で、20度での値は、フィリピンとコレ  
ステロール、エルゴステロール、エピアンド  
ロステロンスピンプローブ、コレスタリンス  
ピンプローブでは、それぞれ、24, 1.2, 0.51,  
0.08 mM<sup>-1</sup>、アンフォテリシンBとコレステ  
ロール、エルゴステロール、エピアンドロ  
ステロンスピンプローブは、それぞれ、2.5, 1.6,  
1.5 mM<sup>-1</sup>である。フィリピンとステロール

の相互作用は、フィリピンではステロールの分子全体にわたっているが、アンフォテリツンBでは、ステロール分子の $3\beta$ -OHの側に中心を置いてゐる。フィリピンはコレステロールを含むフォスファチド膜の流動性を増加させたのに対し、アンフォテリツンは少しではあるが減少させた。フィリピンとエピアンドロステロンスピンプローブの相互作用は脂質膜の相変化の影響を強く受け、液晶相から固相へ転移すると結合してゐる成分は急に増加し、最大分離幅も大きくなった。アンフォテリツンBとエピアンドロステロンスピンプローブの相互作用に対しては、この相転移の影響はどれ程大きくなはなかつた。

これらの結果は de Kruijff と Demel の提唱したモデル(6) を支持するものであつた。

## 略語表

- DEPC: ディエライドイルフォスファチヂルコ  
リン (Dielaidoyl phosphatidyl choline)
- DMPC: デミリストイルフォスファチヂルコ  
リン (Dimyristoyl phosphatidyl choline)
- DPPC: ディパルミトイルフォスファチヂルコ  
リン (Dipalmitoyl phosphatidyl choline)
- egg PC: 卵黄フォスファチヂルコリン (egg yolk  
phosphatidylcholine)
- PC\* : フォスファチヂルコリンスピンプロー  
ブ (phosphatidyl choline spin probe)
- 5SAL : ステアリン酸スピンプローブ (N-oxy-  
4',4'-dimethyloxazolidine derivative of 5-  
ketostearic acid)
- EASP : エピアンドロステロンスピンプロー  
ブ (epiandrostan spin probe)
- CSP : コレスタノンスピンプローブ (cholestanone  
spin probe)
- ASP : アンドロスタノロンスピンプローブ

(androstanolone spin probe)

Tempo : テンポスピンプローブ (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl)

DMSO : ジメチルスルフォキッド (dimethylsulfoxide)

## 序論

この論文は、著者の「生体膜の構造と機能に関する研究」の一部をなすものであり、テトラヒメナの膜画分の生育温度による脂質組成と流動性の変化〔1〕、テトラヒメナの膜画分のエルゴステロール置換による脂質組成と流動性の変化〔2〕、テトラヒメナの膜画分間の磷脂質交換と膜の流動性〔3〕に続くものである。ここでは、生体膜を構成する脂質の主要な成分の一つであるステロールに注目し、その機能を探るためにステロールと特異的に結合するポリエー系抗生物質を導入し、脂質の人工膜系でスピンドラブル法を用いて、ポリエー系抗生物質とステロールの相互作用を分子レベルで研究した。

1950年に、HazenとBrownが発見したフンギツヂン (fungicidin, 現在の nystatin) 以来〔4〕、ポリエー系抗生物質 (polyene antibiotic) に属するものは、すでに、70種近くが発見されている。短時間のうちに、この様に多数のものが発見され

研究されてきたのは、ポリエン系抗生物質が従来の抗生物質とは異なり、バクテリア(bacteria)には効果がなく、真菌類(yeast, filamentous fungi)に有効であるという特徴が注目を集めたからである。実際に、難治とされていた疾病の、例えば、産婦人科の領域では皮膚系状菌や糸状菌による感染症の、治療に用いられており成果をあげている。一方では、この抗生物質の作用機作について、Gottliebと彼の共同研究者が、ポリエン系抗生物質の一つであるフィリピン(filipin)が真菌の膜に存在するステロールと相互作用して、抗真菌活性を示している可能性を指摘して[5]以来、多くの研究者によって、この観点からの研究がなされてきている。

マクロライド環(macrolide ring)を持つことが、ポリエン系抗生物質の化学構造の特徴でありこの共役二重結合部分の吸収の変化に注目して、各種ステロールとの相互作用が、水溶液中[6,7,8]、人工脂質膜[9,8,9,10]、生体膜[8,10,11]

で研究されている。また、イオン、糖、蛋白質の漏出の測定より、膜の透過性の変化が、人工膜〔10,11,12,13,14,15,16〕と細胞膜〔10,11,17〕について調べられている。さらに、電子顕微鏡による、この抗生物質が作る構造物の観察では、フィリピンにより人工膜と細胞膜の中に直径が200から300オングストロームの構造が見られた以外は、調べられた他の抗生物質では、特別な構造は観察されなかった〔9,18,19,20,21〕。その他、脂質の単分子膜の表面張力〔1,22〕、円偏光二色性〔9〕、蛍光スペクトル〔9,23,24,25,26〕、また、イオンの透過に注目した電気的測定〔27,28,29,30〕などでも研究されている。これらについては、最近、Normanによって綜説が著わされている〔31〕。

この抗生物質が生体膜や人工膜内のステロールに作用することから、ステロールの膜内での機能に注目した示差走査熱量分析計〔7,8,10〕、蛍光ラベルの偏光解消〔32〕、水素原子の核磁気共鳴〔33〕などによる研究も行われている。

ステロールの脂質膜内での機能については、Demel & de Kruyffの綜説もある[34]が、その主な機能は脂質膜の液晶相で磷脂質の配向を良くして構造を安定化し、固相では逆に配向を乱すことであり、また、単純脂質の液晶相と固相の転移点の温度幅を拡げて不明瞭にすることである。コレステロール(cholesterol)によるこの効果は、各種ポリエン系抗生物質で打ち消されることが示差熱分析で示された[9,8,10]が、蛍光ラベルではアンフォテリツンB(amphotericin B)によって[32]、核磁気共鳴ではフィリピンとアンフォテリツンBによって[33]、コレステロールの効果は打ち消されなかったと報告されている。

以上のように、研究はかなり進められているが、結果の要点をまとめると、フィリピンは200から300オングストロームのポットを形成する[18,19,20,21]ことで膜構造を破壊し[11]、アンフォテリツンBは内径8オングストロームの穴を形成して[18]、膜の透過性を変えること



また、ステロールの側には  $3\beta$ -OH, 平面層格、C17位の側鎖が要求される[7,8,11,25]ことである。分子レベルでの相互作用の研究は分光学的な技術を用いて、主に、ポリエー系抗生物質の側から調べられてゐる。ステロールの側からは、最近、Flick & Gelerinter がステロイドのスピンラベル試薬、コレスタノンスピンプローブ、を用いてフィリピンがこの分子の配向を膜に垂直な方向から平行な方向に変えることを示した[35]が、彼らはステロールがその機能を発揮するのに重要な  $3\beta$ -OH の替りにスピンラベル基を結合させてゐるために、ポリエー系抗生物質に対する結合能が低下して、異常に高い濃度のフィリピンを用いなければならなかつた。また、それは脂質の積層の重膜の実験であり、脂肪酸スピンプローブを用いた脂質のベシクル(Lipid vesicle)の実験では相互作用を観察できなかつた。

この論文では、新しく  $3\beta$ -OH を持つステロール類似スピンラベル試薬、エポアンドロス

テロンスピンプローブ、を合成して用いた。  
この試薬はポリエー系抗生物質に対する充分な結合能を保持しており、それ程高くない抗生物質濃度でステロールの側から、相互作用を調べる実験ができた。さらに、フォスファチグルコリンのスピラベル試薬を用いてフォスファチグルコリン領域でのポリエー系抗生物質のステロール効果に対する影響を調べることができた。

ところで、治療に用いられるとき、ポリエー系抗生物質は真菌の膜に存在するエルゴステロール (ergosterol) に作用して、抗菌性を示すが、一方では人体の細胞膜のコレステロールにも作用するため副作用を示すことになる。そこで、コレステロールには親和性がなく、エルゴステロールに親和性のある抗生物質が求められている。Bittmanと彼の共同研究者は、フィリピンに対する各種ステロールの解離定数を求めた。彼らは、ステロールと結合してのなりフィリピンと結合している

フィリピンの分子吸光係数を用いて、水溶液中とステロールを含む人工脂質膜中のフィリピンの間の解離定数を求めた〔27〕。この論文では、彼らと違って、人工脂質膜内に存在しているフィリンまたはアンフォテリシンBと、ユレステロールまたはエルゴステロールとの結合定数をエピアンドロステロンスピンプローブを用いて求める方法を考案し、実際に求めた。さらに、この結合の状態が温度や脂質の相の状態によってどのように変化するかを、合成のフォスファチジルコリンと卵黄のフォスファチジルコリンを用いて研究した。また、従来の光学的技術も結果の比較のために用いた。

## 材料と方法

## a. ポリエン系抗生物質

フィリピンは Upjohn Co. (Kalamazoo, Mich.) の Whittfield 博士の御好意により入手した。純度は  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  と  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を等モル含むツリカゲル (silicagel) H (type 60, Merck) の薄層板上で、塩化メチレン (methylene chloride); メタノール (methanol) (85:15 v/v) により、暗室中で展開して調べた [36]。フィリピンの I から IV までの成分 [37] が点 (spot) として生じたが、フィリピン III が 90 パーセント以上を占めていたので、さらに精製はせず、フィリピン III として実験に用いた。

アンフォテリシン B は、Fungizone, E.R. Squibb and Son 社 (New York) より購入して、精製はせずにそのまま用いた。

これらの抗生物質は、使用までは冷凍庫に光を避けて、粉末のまま保存し、使用の直前にジメチルスルフォキッド (dimethyl sulfoxide) (以後は DMSO と略称する) に溶解して、50mM の溶液とした。ポリエン系抗生物質の活性と

吸収スペクトルには相関があり、図1には、フィリピンの吸収スペクトルの変化を示した。DMSOに溶解後、時間の経過と共に活性を失い、それに従って、長波長の側のピークが減少する。アンフォテリシンBでも、全く同様な結果が得られた。活性は赤血球の溶血で調べた(38)。DMSOに溶解した直後のこれらの抗生物質は0.25 mMで完全な溶血を起こすが、二週間後のものは、ほとんど溶血を起こさない。実験には、充分に活性を持つ状態で用いた。また、この実験で用いたDMSOの濃度は最高でも1パーセント以下であり、この濃度領域では結果に影響を与えないことを確認した。

## 6. 磷脂質

ダイライドイルフォスファチジルコリン(Di-  
elaidoyl phosphatidylcholine)(以後はDEPCと略称する)と  
ダイミリストイルフォスファチジルコリン(Di-  
myristoyl phosphatidylcholine)(以後はDMPCと略称する)

はグリセロフォスホリルコリン (Glycerophosphorylcholine) をそれぞれ、エライジン酸 (Elaidic acid) (半井化学薬品) とミリスチン酸 (Myristic acid) (半井化学薬品) でアシル化することによって合成した [39]。また、卵黄フォスファチルコリン (Egg yolk phosphatidylcholine) (以後は egg PC と略称する) は、Singleton の方法 [40] により鶏卵の卵黄より得た。これら三つの磷脂質は、ツリカゲル G (type 60, Merck) の薄層板上で、ワロホルム (chloroform) : エタノール : 酢酸 (acetic acid) : 水 (50:30:8:4 by vol.) により展開した結果、どれも一つの点しか示さなかった。これらは、10mg/ml のベンゼン (benzene) 溶液として、使用までは冷凍庫に保存した。

### C. ステロール

コレステロールは半井化学薬品より購入した特級試薬をエタノール (ethanol) 中で再結晶した。エルゴステロールは岐阜大学の有賀博士より、精製したものを提供して頂いた。

これは、ツリカゲルH (type 60, Merck) の薄層板上でヘキサン (hexane): エーテル (ethyl ether) (50:50 v/v) で展開した結果、一つの点しか示さなかった。使用までは、10mg/ml のベンゼン溶液として、冷凍庫に保存した。

#### d. スピンラベル試薬

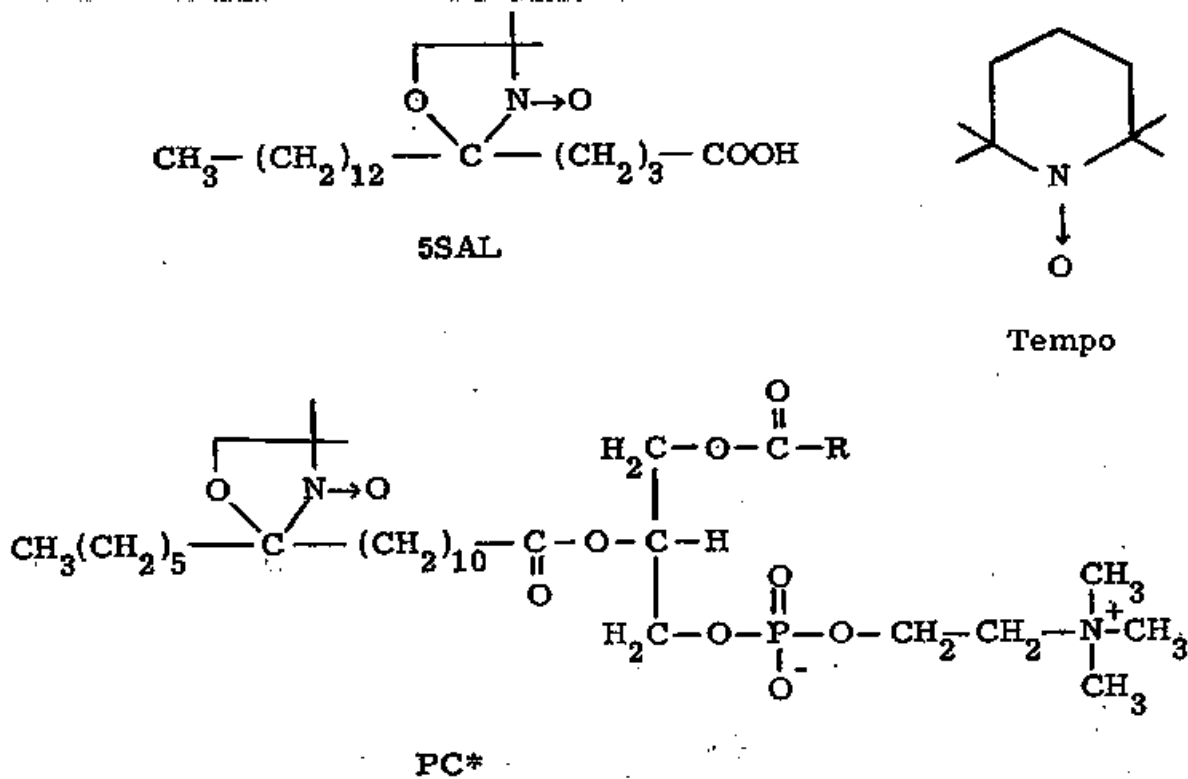
エピアンドロステロンスピンプローブ (Epiandrosterone spin probe) (以後はEASPと略称する) は 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol-17-one (Sigma) より、コレスタノンスピンプローブ (cholestanone spin probe) (以後はCSPと略称する) は 5 $\alpha$ -cholestan-3-one (※ 井化学薬品) より、それぞれ、Keana 3 の方法 (41) により合成した。EASPは珪酸 (silicic acid) (100 mesh, Mallinckrodt) カラム中をヘキサン:エーテル (50:50 v/v) で溶出することにより精製した。それはツリカゲルH薄層板上でカラムと同じ溶媒で展開すると一つの点を示した。CSPはエタノール中で再結晶を行い、黄色の結晶を得た。ステアリン酸スピンプローブ

(N-oxy-4,4'-dimethyloxazolidine derivative of 5-keto stearic acid) (以後は 5SAL と略称する) は, Hubbel の方法 [42] で合成した。これはツリカゲル G 薄層板上の石油エーテル (petroleum ether) : エーテル : 酢酸 (70:30:1 by vol.) による展開で一つの点を示した。フォスファチルコリン スピンプローブ (phosphatidylcholine spin probe) (以後は PC\* と略称する) は Hubbel の方法 [42] によって、ライソフォスファチルコリン (Lyso phosphatidylcholine) にステアリン酸スピンプローブ (N-oxy-4,4'-dimethyloxazolidine derivative of 12-ketostearic acid) を導入した。これはツリカゲル G 薄層板上のクロロホルム : メタノール : 酢酸 : 水 (50:30:8:4 by vol.) による展開で一つの点を示した。テンポスピンプローブ (2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxy) (以後は Tempo と略称する) は Aldrich chemical Co., Inc. (Milwaukee, Wis.) より購入した。

これらのスピラベル試薬は、Tempo 以外はベンゼン溶液として使用までは冷凍庫に保存



した。Tempo は緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 溶液として使用までは冷凍庫に保存した。下は, 5SAL, Tempo, PC\* の化学構造を示す。EASP, CSP の化学構造は図 7 に, コレステロール, エルゴステロールと比較して示してある。



### e. リポゾーム (Liposome) と ヴェジクル (Vesicle) の調製

ベンゼン溶液から必要量の脂質 (燐脂質, ステロール, スピコンラベル試薬) を小さな試験

管に取り、ベンゼンを窒素気流下で気化させて取り除く、さらに、真空ポンプによる減圧下に2時間以上置くことで完全を期する。

これに、磷脂質の濃度がほぼ10mg/mlになるように緩衝液(150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.5)を加え、さらに、小さなガラス玉を5から10個加えて40度前後の温度でサーモミキサー(Thermonics社、東京)によって30秒間、攪拌する。このようにして調製した脂質分散液は、99重層の膜構造をしており、大きさは直径1000オングストロームから1ミリロン程度である。これを以後はリポゾームと呼ぶ。

調製したリポゾームを小さなべんに入れ、窒素気流下、0度で3分間、超音波処理する(海上電機製、20kHz 超音波菌体破壊装置、直径7mm振動子、出力目盛40)。この処理により、直径200から500オングストロームの1枚膜の脂質分散液を得る、以後は、これをヴェソクルと呼ぶ。この程度の超音波処理では脂質の変性は、ほとんど生じていない。

[43]。

### 十、脂質二重層 (Lipid bilayer) の相転移 (Phase transition) と流動性 (Fluidity) の測定

4mg の DEPC を 0.1ml の緩衝液中でリポソームに調製し、最終濃度が 0.24 mM になるように Tempo を加える。これを  $15,000 \times g$ 、15分間 10度で遠心し (富永製作所製 RS-18-II 冷凍遠心機)、その沈渣を ESR 測定する。そのスペクトルから、Tempo パラメータ [44] を計算するが、その方法は結果の中で詳しく述べる。

2mg の DEPC と 10 $\mu$ g の SSAL を 0.1ml の緩衝液中でリポソームとガエツクルに調製する。また、2mg の DMPC と 10 $\mu$ g の SSAL でも上と同様な調製をする。これらの試料の ESR スペクトルより、オーダーパラメータ (order parameter),  $S$ , を、 $S = \frac{T_{11} - T_{12}}{T_{22} - T_{23}} = \frac{T_{11} - T_{12}}{27G}$  の式で計算する [42] が、オーダーパラメータについては、結果の中で詳しく説明する。

2mg の egg PC と 20 $\mu$ g の PC\* にコレステロー

ルの量を変えて加え、0.2 ml の緩衝液中でリポゾームに調製する。その ESR スペクトルより、オーダーパラメーターを求める〔42〕。

1.8 mg の DEPC と 10 mg の EASPI にコレステロールの量を変えて加え、0.2 ml の緩衝液中でガエソールに調製する。その ESR スペクトルの低磁場側と中央のピークより、または、高磁場側と中央のピークより、それぞれ、回転相関時間 (Rotational Correlation Time),  $\tau_c$ , を Kivelson の方法〔45〕によって計算した。この回転相関時間については、結果の中で説明する。一方、スペクトルを積分して吸収強度を求め、一定の吸収強度に規格化したスペクトルのピークの高さを測定した。

### 9. 培養温度を変えたテトラヒメナ細胞の膜分画の脂肪酸組成と流動性の測定

*Tetrahymena pyriformis*, WH 14, をまず通常の生育温度 (25 度) で 24 時間、プロテオース = ペプトン培養液 (2% プロテオース = ペプトン (

proteose peptone, Ditco), 0.5% デキストロース (dextrose, 荳科化学製品), 0.2% イースト抽出物 (yeast extract, Ditco), Fe-EDTA 複合体) 中で培養し、高温生育細胞はさらに 34 度で 14 時間、低温生育細胞は 15 度で 28 時間培養した。これらの細胞から、繊毛 (cilia)、細胞外膜 (pellicles)、ミクロゾーム (microsome) を野沢の方法 [46] に従って分離した。この膜分画からの脂質の抽出は Bligh & Dyer の方法 [47] で行った。磷脂質の脂肪酸側鎖の分析と定量はメチルエステル (methyl ester) 化して、ガス液体クロマトグラフィー (gas-liquid chromatography) で行った (日本電子製, JGC-1100 ガスクロマトグラフ)。

膜分画は、5SAL の薄層を張った試験管中で 29 度、5 分間のインキュベーション (Incubation) することによってスピンドルした。また、細胞外膜から抽出した脂質は、5SAL を加えてリポゾームに調製した。

## h. ポリエン系抗生物質の作用の測定

ポリエン系抗生物質がガエツワルを融合させる作用を調べるには、2mgのDEPCと0.5mgのPC\*を1mlの緩衝液中で、一方、10mgのDEPCを2mlの緩衝液中で、別々に、ガエツワルに調製する。前者の0.1mlと後者の0.2mlを混合し、50mMのポリエン系抗生物質20 $\mu$ lを加えて、ESRスペクトルを時間を追って20度で測定する。対照は、DMSO 20 $\mu$ lを加えて、同様な測定をする。この試料は、高濃度のスピンプローブを含むので、スピンスピン交換相互作用のために、線幅の広いスペクトルを与える。これがスピンプローブを含まないガエツワルと融合すると、プローブの濃度が低下するため交換相互作用が小さくなり線幅が減少する。この変化を一定の吸収強度に規格化されたスペクトルの中央ピークの高さを求めることで定量化した。コレステロールを含む試料は、2mgのDEPC, 0.4mgのコレステロール, 0.5mgのPC\*を1mlの緩衝液中で、一方、10mgのDEPCと2mgのコレステ

ールを 2ml の緩衝液中で、別々に、グエツワ  
ルに調製して、上のコレステロールを含まな  
いときの試料と同様にして実験を行った。

ポリエー系抗生物質がコレステロールによ  
って低下した脂質二重層の流動性にどんな影  
響を与えるかを調べるには、20mg の egg PC と  
0.2mg の PC\* にコレステロールを 2mg, 3mg また  
は 4mg 加え、2ml の緩衝液中で調製したりホ  
ゾームを用いた。この 0.2ml にポリエー系抗  
生物質の濃度を変えて加え、30度で 30 分間の  
インキュベーションの後、20度で ESR スペク  
トルを測定して、それよりオーダーパラメー  
ターを求めた〔42〕。

ポリエー系抗生物質と EASP の相互作用の温  
度変化と脂質の相変化の影響を調べるため  
には、10mg の DEPC と 50 $\mu$ g の EASP を 1ml の緩衝液中  
でグエツワルに調製し、その 0.3ml に 22.5 $\mu$ l の 50  
mM ポリエー系抗生物質を加え、37度で 15 分  
間のインキュベーションをする。不溶の抗  
生物質と大きなりホゾームを除くために、2000

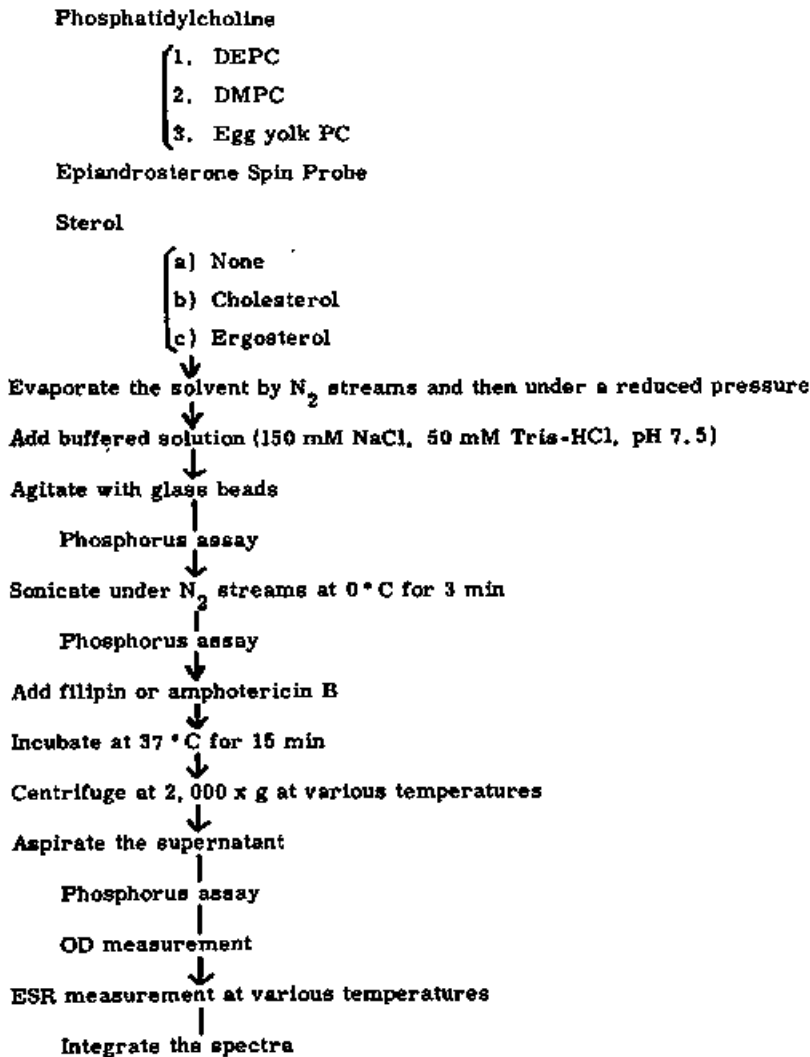
×g, 20度, 20分間の遠心を行う。この上澄中のグエツワルに取り込まれたフィリピンはEASPの10倍, アンフォテリツンBは6倍の分子数であった。この上澄の試料について、各温度でESR測定を行った。これらのESRスペクトルより、ポリエニ系抗生物質と相互作用している成分の割合と最大分離幅を求める。その求め方については、結果の中で述べる。

ポリエニ系抗生物質とステロールの脂質二重層内での結合定数を求めるには、次頁の図に示すような手順に従って実験を行った。

10mg(12 $\mu$ mole)のDEPCにEASPは1モルパーセント, 50 $\mu$ g(0.12 $\mu$ mole), ステロールを加えるときは9モルパーセント, 500 $\mu$ g(1.2 $\mu$ mole)を入れる。これを1mlの緩衝液中でグエツワルに調製する。この0.3mlに, 22.5 $\mu$ lの50mMポリエニ系抗生物質を加えて, 37度で15分間インキュベーションし, 2,000×g, 20度で20分間遠心する。その上澄を取り, 20度でESRスペクトル



## EXPERIMENTAL PROCEDURE



の測定をする。  
 各段階で、Bartlettの方法[48]で磷脂質の定量をし、上澄について、さらに、50 $\mu$ lを5mlの50%エタノール溶液に取り、フィリピンは337nm、アンフォテリツンBは385nmの吸光度と

れぞれの分子吸光係数からの定量を行う。

フィリピンはステロールと等量の分子が、アンフォテリツンBはステロールの5分の1の分子が脂質二重層内に存在していた。これより結合定数を求める方法は、結果の中で

詳しく述べる。

ポリエーテル系抗生物質を扱うときは、つねに光を避けて実験した。

### イ. ESRスペクトルの測定

ESRスペクトルは試料を水溶液用の石英試料管につめて、日本電子製のME-1X ESR装置で行った。温度を変えるときは、温度可変装置を付けて、1分間に0.5度の割合より大きくなるように変化させた。

スペクトルの積分は、JEOL 980A コンピューターで、積分用のプログラム (CWEC 02-741212 CW ESR ACCUM) を用いて行った。

### ロ. ポリエーテル系抗生物質の吸収スペクトルの測定

ポリエーテル系抗生物質は  $12.5 \mu\text{M}$  の緩衝液 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 溶液にして、フィリピンは 280 から 380 nm, アンフォテリシン B は 340 から 440 nm の吸収スペクトルを、ユ

ニオン技研製 RA-112高感度分光光度計で22度で測定した。ステロールまたはステロイドスピンプローブに対する相互作用を調べるときは、さらに、10mMのステロールまたはステロイドスピンプローブのエタノール溶液の10mlを4mlに加えた。スピンプローブはこの領域に吸収があるので、この時は、対照にも同量のスピンプローブを加えて測定した。スペクトルの変化は、 $\epsilon_{230}$ と $\epsilon_{210}$ の比で示した[6]。フィリピンでは $\frac{OD_{358}}{OD_{356}}$ 、アソフォテリツンBでは $\frac{OD_{358}}{OD_{411}}$ である。

## 結果

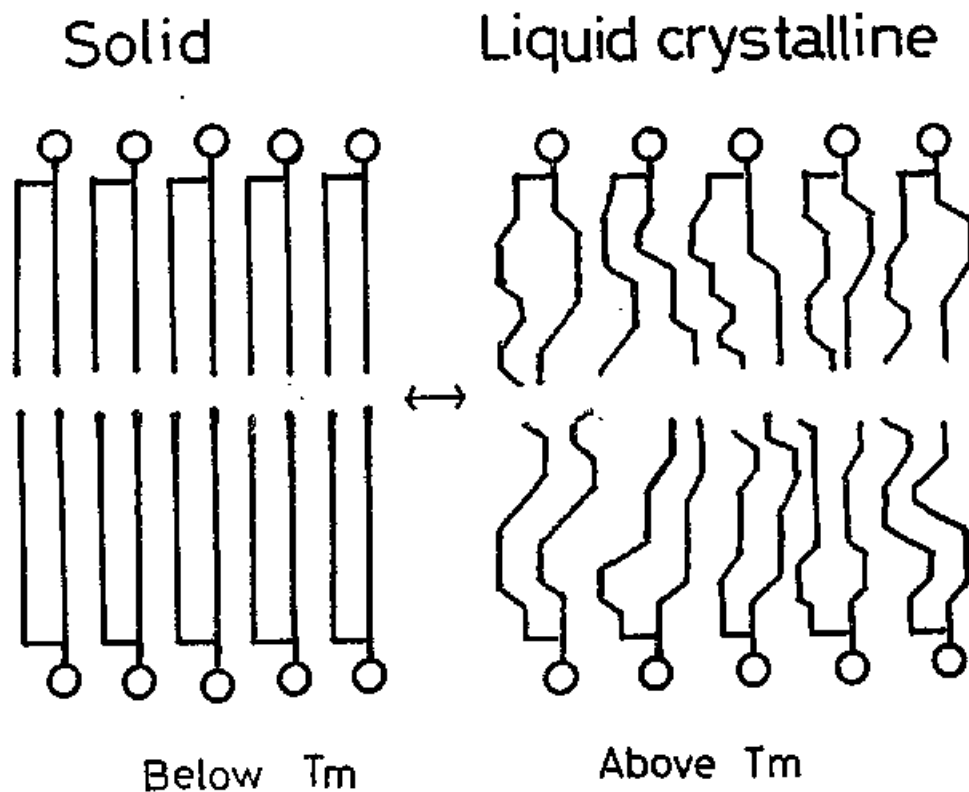
実験は、ポリエーテル系抗生物質の作用を研究するために採用した人工脂質膜系の物性を明らかにすることから始めた。次に、その物性に対して、ステロールがどのような様な効果を示すかを調べた。ポリエーテル系抗生物質の作用は、まず、実験系として採用した人工脂質膜系にどのような影響を与えるかを調べた。そして、これらの結果の上に立って、ポリエーテル系抗生物質とステロールの人工脂質膜内での相互作用を研究した。

### 1. 脂質二重層の相転移と流動性

#### 1a) 相転移

脂質の相転移については、最近、Lee が総説を著わしている[49]。この場合、相転移とは固相 (solid phase) と液晶相 (liquid crystalline phase) の間の転移のことであり、最初、X線回折によって研究されたものである。相転移温度の上下で、X線の回折像に変化があり[50]、固

相が液晶相に転移すると、二つの隣接する隣脂質分子間の距離が、ある一つの実験では、4.8 オングストロームから5.3 オングストロームに不連続的に変化した。この分子間距離の増加に伴い、固相ではすべての脂肪酸側鎖の炭素-炭素結合がトランス型(trans)であったのが、液晶相ではゴーシュ(gauche)型も取るようになる。その変化を模式的に表わすと下の図のようになる。



Tempo<sup>o</sup>ローブは、水相と脂質相に分配して

存在するが、脂質が固相から液晶相に転移すると、脂質相への Tempo の溶解度が増して、分配が脂質相の側に大きく変化する。このプローブは小さい分子であり球に近いので、等方的な速い回転を行っており、不對電子と窒素核との超微細相互作用で三本のピークよりなる ESR スペクトルを示す。ところで、この相互作用は不對電子密度に比例しており、溶媒の極性(polarity)で電子密度が変化するため、その高磁場側のピークは水相と脂質相で吸収位置が異なる。したがって、この両成分のピークを積分して、それぞれ吸収強度を求めれば、分配率を定量化することができると。実際には、この両ピークの線幅は、ほぼ等しいので、図 2 に示すようにその高さの比を計算して相変化を捉えている [44]。これより、この論文で主に用いている DEPC は、13 度で固相と液晶相の相転移が起っていることがわかる。

#### 1b) 流動性

この論文では、脂質二重層の流動性をスピ  
ンプローブで見た ESR スペクトルから測定し  
ている。SSAL, PC\* などの脂質スピ  
ンプローブは細長い分子であり、脂質二重層に取り込  
まれると、その長軸のまわりに異方的な回転  
をするようになる。そこで、このような場  
合の ESR スペクトルの解析を考える [42]。

ニトロキッドラヂカル (nitroxide radical) の基  
礎スピンハミルトニアン (basic spin Hamiltonian) は

$$H = |\beta| S \cdot g \cdot H + h S \cdot T \cdot I - g_N \beta_N I \cdot H$$

$H$ : 外部磁場ベクトル

$g$ : 電子  $g$  テンソル (electronic  $g$ -factor  
tensor)

$T$ : 超微細相互作用テンソル (hyper-  
fine tensor)

$S$ : 電子の角運動量演算子 (electron  
spin angular momentum operator)

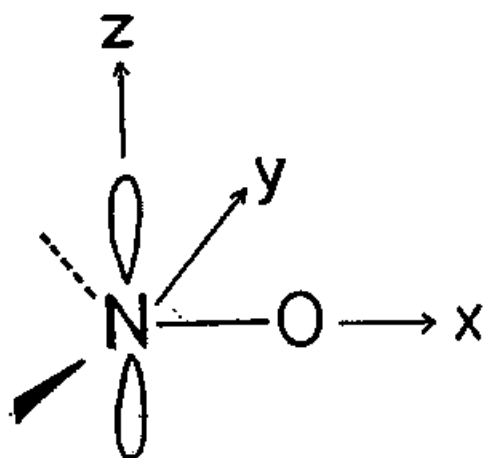
$I$ : 核の角運動量演算子 (nuclear  
spin angular momentum operator)

$\beta, \beta_N$ : 電子と核のボーマン磁子

(electron and nuclear Bohr magnetons)

$h$ : プラークの定数 (Planck's constant)

と表わされる。左下図のように、分子に固



定した主軸系を取ると、実験から得られた  $g$  と  $T$  の主値は次のようになる。

$$(g_{xx}, g_{yy}, g_{zz})$$

$$= (2.0089, 2.0058, 2.0021 \pm 0.001)$$

$$(T_{xx}, T_{yy}, T_{zz})$$

$$= (5.8, 5.8, 30.8 \pm 0.5) \text{ ガウス}$$

分子が運動すると、このスピンハミルトニアンは時間依存性になるが、これを有効時間非依存ハミルトニアン (effective time-independent Hamiltonian),  $\mathcal{H}'$  と時間依存ハミルトニアン (time-dependent Hamiltonian),  $\{\mathcal{H}(t) - \mathcal{H}'\}$ ; に分ける。

$$\mathcal{H}(t) = \mathcal{H}' + \{\mathcal{H}(t) - \mathcal{H}'\}$$

$$\mathcal{H}' = |\beta| \mathcal{S} \cdot \mathcal{g} \cdot \mathcal{H} + h \mathcal{S} \cdot \mathcal{T}' \cdot \mathcal{I} - g_N \beta_N \mathcal{I} \cdot \mathcal{H}$$

運動が充分に速いとき ( $\tau_c \ll 10^{-11}$  秒)。  $\{\mathcal{H}(t) - \mathcal{H}'\}$  の項は平均化されて、無視できる程に小さく



なる。軸対称回転のときには、回転軸に垂直な異方性成分は平均化されるので、パラメータは回転軸に垂直と平行の成分  $g'_{\parallel}, g'_{\perp}, T'_{\parallel}, T'_{\perp}$  の四つに存る。スピンプローブ分子の回転軸,  $z'$ , が、ラゲカルの主軸系,  $x-y-z$ , に対して、方向余弦が  $\alpha, \beta, \gamma$  の向きにあるとき、

$$g'_{\parallel} = \bar{\alpha}^2 g_{xx} + \bar{\beta}^2 g_{yy} + \bar{\gamma}^2 g_{zz}$$

$$g'_{\perp} = \frac{1}{2} \{ (1 - \bar{\alpha}^2) g_{xx} + (1 - \bar{\beta}^2) g_{yy} + (1 - \bar{\gamma}^2) g_{zz} \}$$

$$T'_{\parallel} = \bar{\alpha}^2 T_{xx} + \bar{\beta}^2 T_{yy} + \bar{\gamma}^2 T_{zz}$$

$$T'_{\perp} = \frac{1}{2} \{ (1 - \bar{\alpha}^2) T_{xx} + (1 - \bar{\beta}^2) T_{yy} + (1 - \bar{\gamma}^2) T_{zz} \}$$

となる。(  $\alpha^2, \beta^2, \gamma^2$  の上の  $\bar{\quad}$  は時間平均を収めることを意味する )  $T_{xx} = T_{yy}$  と  $\alpha^2 + \beta^2 + \gamma^2 = 1$  を用いると  $T'_{\parallel}$  と  $T'_{\perp}$  の二つの式から、簡単な計算で、

$$S = \frac{1}{2} (3\bar{\gamma}^2 - 1) = \frac{T'_{\parallel} - T'_{\perp}}{T_{zz} - T_{xx}}$$

を得る。 $T_{zz}$  と  $T_{xx}$  は結晶での測定から得られており、 $T'_{\parallel}$  と  $T'_{\perp}$  は ESR スペクトルから、 $2T'_{\parallel}$  と  $2T'_{\perp}$  として得られる (図4を参照)。この  $S$  がオーダパラメータであり、 $S=1$  のとき、スピンプローブの分子が一つの軸のま

わりに、ふれのない軸対称回転を行っていることを意味し、 $\delta$ が小さくなるにつれて回転軸のふれが大きくなり、 $\delta=0$ では完全に等方的な回転になっていることを意味する。したがって、オーダーパラメーターは膜の流動性のよい指標となり、 $\delta$ が減少することは流動性が増したことを示す。

脂質二重層内に取り込まれた 5SAL の運動は温度によって変化するとともに、脂質の相転移の影響を大きく受ける。図3の上図に示すように、DMPC のリポゾームでは22度で、DEPC のリポゾームでは13度で、液晶相から固相への相転移が起こると 5SAL の運動は急に強い束縛を受けようになる。

### 1c) 超音波処理の効果

フォスファチジルコリンのリポゾームを超音波処理すると、一枚膜の直径が200から500オングストローム、分子量が約 $10^6$ のヴェリクルになる[51,52]。図3の下図はDEPCとDMPCのヴェリクル中の5SALの $\delta$ の温度変化を調べ

たもので、相転移温度での流動性の急激な変化は見られなくなっている。これは、ヴェッワルガリホゾームと比較して小さくなっており、そのため、協同作用する分子の数が少なくなり過ぎたことによると考えられる〔53〕。

#### 1d) 脂質組成と、相転移または流動性

フォスファチジルコリンの相転移の温度はその脂肪酸側鎖によって決まる。長鎖の脂肪酸になる程、転移点の温度は高くなり、炭素数14のDMPCでは22度であるが、16のジパルミトイルフォスファチジルコリン(Dipalmitoylphosphatidylcholine) (以後はDPPCと略称する)は41度、18のジステアロイルフォスファチジルコリン(Distearoylphosphatidylcholine)は58度になる。

そして、不飽和結合が入ると転移点の温度は下がり、それも、トランスよりもシス(cis)の方が下がり方は大きい、さらに、脂肪酸の中央部程、その効果は大きい。トランス二重結合のDEPCでは13度であるが、シス二重結合のジオレイルフォスファチジルコリン(Di-

oleoylphosphatidylcholine) では  $-22$  度である。

したがって、生体膜では磷脂質の脂肪酸側鎖の組成を変えることによって、膜の流動性の調節がなされているはずである。次に述べるのは、異なる培養温度のテトラヒメナ細胞を用いて、脂質組成と流動性の関連を調べた実験の結果である。

まず、通常の生育温度、 $25$  度、で培養した細胞から、各膜分画を分離して、SDALでスピンラベルしたときの、ESR スペクトルと  $\delta$  の温度変化を図4に示す。測定したどの温度でも流動性は、織毛、細胞外膜、ミクロゾームの順に大きくなる。この順序は、テトラヒメナが持つステロールであるテトラヒマノール (tetrahymanol) のそれぞれ別の膜での含量の順序の逆である。したがって、それぞれの膜分画の流動性はテトラヒマノールによって決められており、織毛にはテトラヒマノールが多いため流動性が小さいと考えられる。

図5は、細胞外膜とその抽出脂質リポゾー

ムの流動性を各温度で比較したもので、これより膜の蛋白質には、脂質二重層の流動性を減少させる効果のあることが分かる。

このように、ステロールと蛋白質は脂質の流動性に影響を与える因子ではあるが、テトラヒメナの培養温度を変えたとき、各膜分画でのこれらの量は、ほとんど変化してゐたので、次の実験では、ステロールと蛋白質の影響は考えなくともよい。

培養温度を変えたときの、テトラヒメナ細胞の膜分画での磷脂質の脂肪酸側鎖の組成の変化が表1に示してある。生育温度が低いと不飽和脂肪酸の割合が増し、高いと飽和脂肪酸の割合が増してゐる。個々の脂肪酸についてみると、飽和脂肪酸  $C_{16:0}$  は、生育温度を低くすると増加し、不飽和脂肪酸  $C_{16:1}$  は、生育温度を高くすると増加してゐる。これらのは、不飽和結合は転移点の温度を下げるという事実から考えて、テトラヒメナは温度の低下による膜の流動性の減少を不飽和

結合を増すことで回復し、温度の上昇による流動性の増加を飽和結合を増すことで回復しようとしている。実際に、このようなホメオスタシス (Homeostasis) が存在することが、次の図6の実験で示された。

繊毛、細胞外膜、ミクロゾームの各膜分画とも、低温(15度)で培養した細胞から分離した膜の方が、高温(34度)で培養した細胞から分離した膜よりも、どの測定温度でも流動性が大きく(図6)、脂肪酸組成とよく対応する。

#### 1e) ステロール類似ラベルの脂質二重層内での運動

この論文では、ポリエン系抗生物質と相互作用するステロイドスピンドローブを用いているので、それが脂質二重層内でどのような運動をしているかをまず調べた。図7にはそのスピンドローブを、コレステロールとエルゴステロールに比較して示してある。ステロールがその作用を示すには、 $3\beta$ -OHの構造が重要である[54,55,56,57]が、その構造を持った


EASPのDEPCの脂質二重層内でのESRスペクトルを図8に示す。DEPCの相転移温度(13度)以上の20度では、ゲツクル(図8の上図)とリポゾームで、そのESRスペクトルはほとんど差がないが、転移温度以下の5度ではゲツクル(図8下図の実線)とリポゾーム(図8下図の破線)では、異なるESRスペクトルを示す。リポゾームでは、より強く束縛されており、相転移がかなり、はっきりと起っていることを示している。しかし、5SAL, PC\*などのスピンプローブでは、固相でもっと大きな運動の束縛が生じるのに対して、EASPではその束縛がまだ不十分である。これは、EASP自身が3 $\beta$ -OHを持つステロール類似のものであるので、いわゆるステロールの二重効果[34]、つまり固相では、その規則構造をこのスピンプローブが乱していると考えられる。

スピンプローブが等方的に速い回転をしているか、または、それに近い運動をしているときは、ESRスペクトルは平均化により異方

性を失い、低磁場、中央、高磁場の3つのピークからなる。このスペクトルの理論的な解析より、プローブの運動の回転相間時間、 $\tau_c$ 、を求めることができる(45)。ESRスペクトルの線幅と $\tau_c$ の間には次の関係がある。

$$\Delta H = \tau_c (A + B M_I + C M_I^2)$$

$\Delta H$ : ピークからピークまでの線幅

 ESRのスペクトルは吸収の微分が記録される。

$$A = \frac{6b^2}{40} + \frac{4}{45} (4g\beta H)^2$$

$$B = -\frac{4}{15} b 4g\beta H$$

$$C = \frac{5}{40} b^2$$

$$b \cong \frac{4\pi}{3} (T_{zz} - T_{xx})$$

$$4g = \frac{2\pi}{h} \left\{ \frac{1}{2} (g_{xx} + g_{yy}) - g_{zz} \right\}$$

$M_I$ : 核の量子数で、低磁場、中央、高磁場のピークは、それぞれ、+1, 0, -1である。

ここで、ESRの吸収線の面積は、ピークの高さと線幅の積の平方根に比例すると仮定すると、線幅をピークの高さで置き換えることが



できる。そのようにして、式を  $\tau_c$  について解き、数値を代入すると、

$$\tau_c = \begin{cases} -3.46 \times 10^{-9} (1 - \sqrt{\frac{h(0)}{h(1)}}) \Delta H(0) & \text{[sec]} \\ -4.80 \times 10^{-9} (1 - \sqrt{\frac{h(0)}{h(1)}}) \Delta H(0) & \text{[sec]} \end{cases}$$

となる。ここで、 $\Delta H(0)$  は中央ホーワの線幅、 $h(1)$ ,  $h(0)$ ,  $h(-1)$  はそれぞれ、低磁場、中央、高磁場のホーワの高さである。一方、この場合、ストークスの法則から、 $\tau_c$  は

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT}$$

$\eta$ : 媒体の粘度 (viscosity)

$r$ : 分子の有効半径 (effective radius)

$k$ : ボルツマン定数 (Boltzman constant)

$T$ : 絶対温度 (absolute temperature)

の式によって計算される。逆に、 $\tau_c$  を ESR スペクトルから求めれば、媒体の粘度を知ることができる。 $\tau_c$  が、大きい程、粘度が高い、つまり流動性が小さいことになる。

EASp のリポゾーム中とゲル中の  $\tau_c$  の温度変化が図 9 に示してある。上の二つが高磁場と中央のホーワから求めた  $\tau_c$  で、下の

二つが低磁場と中央のピークから求めたものである。これら二つの方法で計算した $\tau$ が一致してゐないのは、最初に等方的な回転であると仮定したことが誤つてゐたこと、つまり、このプローブは<sup>(異方的な)</sup>回転を行つてゐることを示唆してゐる。これは、EASPの分子の形を考えれば、その長軸を膜面に垂直にして軸対称な回転を行つてゐると考えられる。

ところで、EASPとCSPは脂質二重層に取り込まれたとき、異なるESRスペクトルを与えるが(図8,18を参照)、これはニトロキッドラウカルの主軸とステロイド分子の長軸の向きの関係によつており、主値の平均化のされ方の差によつてゐる。Pauling-Corey-Koltun分子模型より求めた、 $\pi$ 軌道と長軸のなす角はEASPでは約60度であるのに対して、CSPでは直角である(図7を参照)。

2. 脂質二重層に対するコレステロールの効果

図10は DEPC のゲッワルでコレステロールの含量を変えたときの、PC\* の 20 度でのオーダーパラメーターである。この論文で、合成燐脂質として DEPC を用いた理由の一つは、相転移の温度が 13 度で、温度変化をさせる時に固相と液晶相を容易に実現できること、もう一つは、0 度での超音波処理でもステロールの不均一分布が生じないこと〔58〕である。コレステロールは脂質二重層をより規則的な構造にする作用が、液晶相ではあることが図10より分かる。

DEPC のゲッワル中で、EASD の回転相関時間がコレステロールによって、どのように変化するかを 20 度で示したのが図11である。相関時間はコレステロール含量が 10 モルパーセントを越えるあたりから増加しており、また、低磁場側と高磁場側から求めた  $\tau_c$  の値は一致してゐない。つまり、コレステロールは 10 モルパーセント以下では、 $\tau_c$  にあまり影響せず、また、プローブは膜内で軸対称な回転

ましている。

回転相関時間,  $\tau_c$ , はスペクトルの線幅に関連しており,  $\tau_c$ が増すと線幅が広くなることは, 前に述べた。そこで, 線幅の替りに, 一定の吸収強度に規格化された ESR スペクトルのピークの高さを示したのが図12であり, コレステロールの含量が10モルパーセントを越えるとピークの高さが減少し始める。つまり, 線幅が変化し始めている。

図13は, egg PCのリップソームに対するコレステロール含量と温度の効果を PC\* のオーダーパラメータで調べたものであり, 10度から20度の間では, コレステロール含量と  $S$  値の変化量には平行関係が見られる。また, 温度を下げるると  $S$  値を増す効果がある。つまり, 液晶相で脂質二重層をより規則的な構造にするには, コレステロール含量を増すか, 温度を下げればよい。

### 3. ポリエン系抗生物質によるメツケル

## の融合

図14には、この実験に用いたポリエー系抗生物質である、フィリピンとアンフォテリツンBの構造を示してある。ポリエー系抗生物質は共通な構造として、共役二重結合の部分と水酸基を持つ部分で環を作っている。共役二重結合部分の疎水性と水酸基部分の親水性が、その活性には重要であると考えられ、実際に、共役二重結合部分に由来する光学吸収スペクトルは、ステロールを加えることで変化し(図20を参照)、ステロールがこの部分と疎水的な相互作用をしていることが示されている〔6,7,8,9,11,16〕。フィリピンは中性の化合物であり、共役二重結合を5つ持つペンタエンである。一方、アンフォテリツンBはカルボキシル基とアミノ基を1つずつ持つ両性イオン化合物であり、共役二重結合を7つ持つヘプタエンである。したがって、吸収スペクトルも、フィリピンよりも長波長側にある(図20を参照)。アンフォテリツンBに

については、そのヨードアツル誘導体の単結晶でX線解析がなされており、立体構造も明らかにされた〔59〕。

図15は高濃度のPC\*を含むDEPCのヴエツワルを、含まないDEPCのヴエツワルと混合したときの、ポリエンス系抗生物質によるスペリトルの時間変化を定量化して示したものである。膜の流動性に変化のない条件下で、一定吸収強度に規格化したスペリトルのピークが大きくなるのは、スピンプローブが希釈されて交換相互作用が減少したことを示している。これは、ヴエツワルが融合したか、脂質の交換がヴエツワル間で起ったかを意味する。これが、ヴエツワル間での単なる脂質の交換ではなく、融合であることは、別の実験で、5SALで見た $\delta$ 値の温度依存性がヴエツワルにフィリピンを加えるよりホゾーム型(図3を参照)に変化したことでも示された。フィリピンによって、かなり早い時期に融合が起っていることが分かる。また、アンフオテリ

シンBでも、程度が少なければ融合が起っている。

図16は、コレステロールを含む DEPC のゲェツクルでの同様の実験である。やはり、フィリピンではかなりの融合が起っていることが示されている。この場合には、アンフォテリシンBでも対照に比較してかなり融合が促進されている。

#### 4. ポリエン系抗生物質とステロイドスピンプローブの相互作用

図17は、ステロイドスピンプローブを含む DEPC のポゾームに、ポリエン系抗生物質を加えたときの ESR スペクトルで、脂質二重層内で自由に運動しているプローブのスペクトル(図8を参照)に、運動を制限されたプローブのスペクトル成分(図中の↓印)が重ね合わされて現われてきている。この成分は、ポリエン系抗生物質の濃度を増すに従って増加した。フィリピンでは、 $3\beta$ -OH を持つ EASP でも

C<sub>17</sub> 側鎖を持つ CSP でも相互作用している成分が見られる。しかし、アンフォテリツン B では、EASP では見られたが、CSP では相互作用している分子の数が少ないためが見られなかった。

低磁場側のローリ (↓印) と高磁場側のトラフ (↓印) の間隔を最大分離幅 (overall splitting) と言い、この幅が大きい程、運動がより強く制限されていることを示す。プローブの運動が非常に遅くなると、リポゾームとかゲルワルの様に全体としては等方的な試料中では、それに従ってニトロキッドラヂカルの主軸も各方向に均一に分布している。この様なときの ESR スペクトルは、運動による平均化を失つ 各方向を向いているプローブのスペクトルを重ね合わせたもの (粉末末スペクトル (powder spectrum)) に近くなる。そして、運動が生じて、それがより速くなるにつれて、その ESR スペクトルは粉末末スペクトルから遠ざかり、最大分離幅が減少していく。フィリピンと EASP では、最大分



分離幅は 65.2 ガウス、フィリピンと CSP では 65.3 ガウスで、ほぼ等しく、両者は同じ程度に運動を抑制するように結合してゐると考えられる。アンフォテリシン B と EASP では、64.7 ガウスで少し小さい。

図 18 には、各種のステロイドスピンプローブとジギトニン (digitonin) との相互作用を示した。サポニン (saponin) の一種であるジギトニンは、 $3\beta$ -OH を持つステロールと特異的に結合することが分つてゐる [60] が、実際に、 $C_{17}$  の側鎖を持つが、 $3\beta$ -OH を持たない CSP、 $C_{17}$  に OH を持つが  $3\beta$ -OH を持たない ASP (Androstan- $17\beta$ -ol-3-one の誘導体のスピンプローブ) とは相互作用せず、 $3\beta$ -OH を持つ EASP だけがジギトニンによってスペクトルの変化が見られた。このときの最大分離幅は 62.5 ガウスで、ポリエーテル系抗生物質のときと比較してかなり小さい。ジギトニンとの結合は  $3\beta$ -OH を中心にしてゐるのに対して、ポリエーテル系抗生物質、特にフィリピンはステロール分子全体に対する

結合であると考えられる。

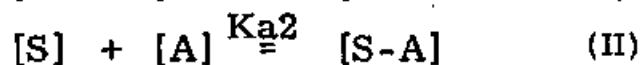
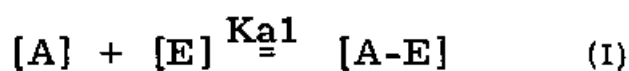
5. 脂質二重層に対するコレステロール効果とポリエーテル系抗生物質の作用。

すでに、図10と図13で、コレステロールは液晶相にある脂質二重層の流動性を減少させることを、オーダーパラメーターの増大で示した。このように、コレステロールによって $S$ 値が増大した egg PC のリポゾームにフィリピンを加えると、その濃度に従って、 $S$ 値が減少する。つまり、流動性が部分的に回復していく(図14)。ところが、アンフトテリツンBを加えたときは流動性の回復は起らず、むしろ、さらに流動性を減少させる効果がある(図14)。後に示すように、どちらの場合もポリエーテル系抗生物質とコレステロールの複合体は生じていると考えられるので、この差は複合体の形または存在状態が異なることを示唆している。

## 6. ポリエン系抗生物質とステロールの脂質二重層内での結合定数

この論文では、ポリエン系抗生物質（フィリピンまたはアンフォテリツンB）とステロールまたはステロイドスピンプローブとの結合定数をESRスペクトルから求めた。その方法は以下に述べる通りである。

### EQUILIBRIUM EQUATIONS



[E]: Free epiandrosterone spin probe

[A]: Free polyene antibiotic =  $\frac{1}{K_{a1}} \times \frac{[A-E]}{[E]}$

[S]: Free sterol =  $[S_0] - [S-A]$

[A-E]: Complex of antibiotic and spin probe

[S-A]: Complex of antibiotic and sterol =  $[A_0] - [A-E] - [A]$

[S<sub>0</sub>]: Total sterol

[A<sub>0</sub>]: Total polyene antibiotic in lipid vesicle

ポリエン系抗生物質とステロイドスピンプローブとの結合定数は、反応の平衡式 (I) よ

り、 $K_{a1} = \frac{[A-E]}{[A][E]}$  として求めた。ポリ  
 エン系抗生物質とステロイドスピングローブ  
 の複合体の濃度、 $[A-E]$ 、はこの複合体が1対  
 1であるとして仮定し(31)、ポリエン系抗生物質  
 と相互作用しているスピングローブの濃度と  
 して、また、 $[E]$  は相互作用していないスピ  
 ングローブの濃度として、ESRスペクトルか  
 ら求めた。このとき、ESRスペクトルは図  
 17に示したように、ポリエン系抗生物質と結  
 合している成分と結合していない成分の2成  
 分よりなる。このスペクトルをコンピュー  
 ターで2回積分して吸収強度を求め、一定の  
 吸収強度に規格化する。但磁場側にある二  
 つのピークは、左側が結合している成分で、  
 右側が結合していない成分である。規格化  
 されたスペクトルで結合していない成分のピ  
 ークの高さを、DMSOだけを加えた対照のピ  
 ークの高さと比較して、その割合を求める。  
 そして、試料中の全スピングローブ濃度と、  
 ここで求めた結合成分と非結合成分の割合よ

り、それぞれの場合の濃度を計算する。結合せむに、脂質二重層に存在するポリエー系抗生物質の濃度、 $[A]$ 、は次のようにして求める。まず、試料の分散液中に含まれるポリエー系抗生物質の全濃度と、脂質を含まない緩衝液に対する抗生物質の飽和濃度を、その分子吸光係数から求め、その差を脂質二重層中の全ポリエー系抗生物質濃度、 $[A_0]$ 、とする。

そして、 $[A] = [A_0] - [A-E]$ として求める。以上の値を用いて、ポリエー系抗生物質とステロイドスピロゾの結合定数を求めた。

ポリエー系抗生物質とコレステロールまたはエルゴステロールとの結合定数は次のようにして求めた。反応平衡式 (I) ともう一つの反応平衡式 (II) を用いる。ポリエー系抗生物質とステロールとの結合定数は  $K_{a2} = \frac{[S][A]}{[S-A]}$  として計算した。この二つの式で、ステロイド分子と相互作用してゐないポリエー系抗生物質の濃度、 $[A]$ 、は共通で等しいから、先に求めたポリエー系抗生物質とステロイドスピ

シンプローブとの結合定数,  $K_{AI}$ , を用いて,  $[A] = \frac{1}{K_{AI}} \times \frac{(A-E)}{(E)}$  として, 求めることができる。ここで,  $\frac{(A-E)}{(E)}$  は ESR スペクトルより, 結合成分と非結合成分の比として与えられる。このとき, ピークの高さは, その幅にも依存しているもので, 結合してのないうステロールの濃度が増減しても, ピークの高さに影響を与えないステロール含量の 10 モルパーセント以内で実験した (図 12 を参照)。また, ステロールと抗生物質の複合体の濃度は,  $(S-A) = [A_0] - (A-E) - [A]$  として与えられる。一方, 結合してのないうステロールの濃度は  $[S] = [S_0] - (S-A)$  として得られる。ここで,  $[S_0]$  は脂質二重層内に存在する全ステロール濃度である。ステロールは初めに, DEPC に対して一定量を測って加えるが, 超音波処理では緩衝液の量が, 遠心ではガエツケルの量が減少するので脂質の濃度は変化する。そこで, 各段階で DEPC の量を定量化して, その濃度に対して一定量のステロールが存在すると仮定して,

(50) を計算する。

以上の方法によって、DEPC ウェツワルの脂質二重層内で求めた 20 度での結合定数は表 2 の通りである。EASP はフィリピンに対して、CSP より 6 倍大きい結合定数を持っている。これは、この相互作用において、C<sub>17</sub> の側鎖よりも 3β-OH の方がより重要であることを示している。また、フィリピンはコレステロールに対しては、エルゴステロールに対する 20 倍の結合定数を持っている。しかし、エルゴステロールに対しては、EASP、CSP に対してよりは大きな結合定数である。フィリピンに対する結合定数の大きさを比で表わすと、コレステロール対エルゴステロール対 EASP 対 CSP は 1:0.05:0.02:0.003 となる。一方、アンフォテリツン B に対しては、コレステロール対エルゴステロール対 EASP は 1:0.64:0.60 である。つまり、フィリピンは相互作用するステロールに対して構造の特異性を強く要求するのに対し、アンフォテ

リシン B は  $3\beta$ -OH の構造以外は、それ程強く要求しない。

7. ポリエン系抗生物質のステロールとの相互作用による吸収スペクトルの変化

図 20 には、ユレステロールによるフィリピンとアンフォテリシン B の吸収スペクトルの変化が示してある。表 3 は、各種のステロールとステロイドスピロプローブによるフィリピンとアンフォテリシン B の吸収スペクトルの変化をピーク 3 とピーク 1 の比で示した (6.1.8) ものである。フィリピン、アンフォテリシン B とともに、スペクトルの変化量の大きさの順序は、ESR スペクトルから求めた DEPC 脂質二重層内での結合定数の大きさの順序とよく一致をしている。

8. ポリエン系抗生物質で処理された DEPC ゲル中の EASP の ESR スペクトルの温度変化



図21には、フィリピンで処理したときのスペクトル変化が示されているが、温度を下げるに従い、フィリピンと相互作用している成分が増加する。その成分は、DEPCが固相へ転移する13度以下で、急速に増し、5度ではほとんど相互作用している成分だけになる。また、アンフォラリンBで処理したときは、やはり、温度を下げるに従って、相互作用している成分は増し、相転移の温度以下で急速に増加するが、その程度はフィリピンに比較すると少ない(図22)。

一方、フィリピン処理したDMPCのリポゾーム中のEASPのスペクトルも、その相転移の温度である22度以上と以下では、フィリピンと相互作用している成分の量はDEPCのときと同様に大きく変化する(図23)。しかし、フィリピン処理したegg PCのゲツクル中では、40度から5度の間で、そのような、相互作用成分の急激な変化は見るれなかった。以上より、この相互作用成分の変化は、脂質の相

変化によって相互作用が影響を受けた結果であると結論される。

### 9. ポリエン系抗生物質と相互作用してゐる成分の定量化とその温度変化

相互作用してゐる成分は、規格化されたスペクトルで低磁場側の相互作用してゐない成分のピークの高さが、対照に対してどれだけ減少してゐるかで求める(結果の第6節を参照)。このとき、相互作用してゐない成分は相転移の温度以下(固相)では、リポゾームとウエツクルでは異なるスペクトルを示す(図8を参照)。定量化するには、この点に充分に注意しなければなるない。そこで、ウエツクルはポリエン系抗生物質によって融合し、リポゾーム型に転換することを確認する必要がある。図24には、ポリエン系抗生物質処理によりDEPCのウエツクルがリポゾーム型に変化することとを一定の吸収強度に規格化されたスペクトルから求めた中央ピークの高さの温度変

化で示してある。　フィリピンまたはアンフォテリツンBの処理により、比較のために示した対照のヴェツワル型からリポゾーム型に変化していることが分かる。したがって、定量にはリポゾーム型のスペリトルを対照として用い、相互作用成分の割合を求めた。

このようにして求めたポリエー系抗生物質と相互作用している成分の割合の温度変化を図25に示す。　フィリピン処理したとき、固相への相転移が起こると、相互作用している成分が30パーセントから80パーセントに増加する。　一方、アンフォテリツンBのときは、その増加は、35パーセントから55パーセントに在るだけである。　そして、これらの変化は可逆的であり、温度を上げるとほぼ元の値まで戻る。　以上より、フィリピンとEASPの相互作用は、アンフォテリツンBとEASPの相互作用よりも強く脂質の相転移の影響を受けることが分かる。

、ポリエン系抗生物質で処理した DEPC の  
ゲツワル中の EASP の最大分離幅の温度変化  
図 26 は、フィリピンまたはアンフォテリツ  
ン B で処理した DEPC のゲツワル中の EASP の  
最大分離幅(図 21, 図 22 を参照) の温度変化を示  
したものである。液晶相では、どちらの抗  
生物質で処理しても、最大分離幅はほとんど  
同じで、約 64.7 ガウスであるが、固相に転移  
するに従い、フィリピンでは 68.5 ガウスまで  
増大するが、アンフォテリツン B は 1 ガウス  
程度増えるだけである。これらの変化は可  
逆的で、温度を上昇させると再び元の値まで  
回復した。以上の結果は、液晶相ではフィ  
リピンとアンフォテリツン B はともにこれら  
の抗生物質と EASP の複合体が同じ程度の運動  
性を脂質二重層の中で持っているが、固相に  
なると、フィリピンでは急激に運動が制限さ  
れるのに対して、アンフォテリツン B ではそ  
れ程制限されないことを示している。とこ  
ろで、どちらの場合も、DEPC 脂質二重層の粘

度は同一温度では等しいと考えるれるので、複合体の運動性はその大きさ(有効半径)によっているとすると、フィリピンとアンフォテリシンBとでは、それぞれ、大きさの異なる集合体として、固相に存在していることが示唆される。一方、egg PC の、ウエツリル中では、フィリピンによるEASPの最大分離幅は40度から5度の範囲で、64から65から程度で、わずかに変化するだけである。つまり、液晶相では、大きな集合体を形成するようになることを示している。

## 考察

ポリエン系抗生物質の作用機作については、種々の物理化学的な方法で研究されている(31)を参照)が、まだ、分子レベルではポリエン系抗生物質とステロールの相互作用は充分には調べられていない。この論文では、生体膜のモデル系として、合成磷脂質(DEPC, DMPC など)または卵黄レツチン(egg PC)を用いた人工膜系を採用した。次に、この膜系の物理的性質(磷脂質の脂肪酸側鎖の変化、温度、超音波処理、ステロール などと、相転移や流動性などとの関連)をスピンドラブル法を用いて、まず、明らかにした。続いて、新しく合成したEASPを主に用い、これにより膜内でポリエン系抗生物質と結合しているステロイドスピンドラブルと結合しているプローブとを合けることができた。そして、この両者を定量化することで、結合定数を求めた。また、この相互作用の温度変化と脂質の相状態との関連を示した。

ポリエン系抗生物質が膜の融合を生じさせることについては、Bittmanらの電子顕微鏡による観察がある(9)。この論文では、膜の脂質にステロールが含まれないときにも融合が起こることを示した。さらに、融合を定量化して時間変化を追うことを可能にしたので、実験系を整えることにより詳細な研究を進める道を開いた。生体膜の融合の機構は、現在の主要な研究テーマの一つであり、多くの研究がなされている。ポリエン系抗生物質は一つの分子内に疎水性部分と親水性部分を持っているので、水溶液中ではミセル(miscelle)を形成し、それが仲介して融合を生じさせていると考えられるが、一方で、ステロールの存在が融合を促進していることから、生体膜の構造と融合の関連を知る上で、今後とも、興味ある研究対象となると思われる。

この論文では、ステロイドスピンプローブを用いることで、ポリエン系抗生物質とステロールの相互作用を分子レベルで示すことが

できた。フィリピンは、 $3\beta$ -OHを持つEASPと $C_{17}$ に側鎖を持つCSPのどちらにも結合し、最大分離幅がほぼ等しいスペリトルを与えた。ポリエー系抗生物質と結合するステロール分子には、 $3\beta$ -OH, ステロイド核,  $C_{17}$ の側鎖が要求される[9, 8, 11, 25]が、フィリピンはこのようなステロール分子の全体にわたって結合しているために、EASPとCSPで等しい最大分離幅が得られたと考えられる。サポニンの一種であるゲキトニンでは、 $3\beta$ -OHを持つEASPとは結合したが、 $C_{17}$ に側鎖を持つCSPと $C_{17}$ にOHを持つASPでは結合しなかった(図18)。ゲキトニンではEASPの最大分離幅が62.5ガウスと小さく、 $3\beta$ -OHを中心とした結合をしていると考えられる。一方、アンフォテリシンBはEASPに対しては結合したスペリトル成分を与えたが、CSPでは与えなかった。つまり、アンフォテリシンBでは、 $3\beta$ -OHに対する要求性がフィリピンよりも強いと思われる。

次に、結合定数からその相互作用を考えて



みると、フィリピンはステロールの種類によつて、その値が大きく変化するのに対して、アンフォテリツンBでは、ステロールの種類によらず、ほぼ等しい値である(表2)。つまり、フィリピンはステロール分子の全体の構造に対する選択性が強いが、アンフォテリツンBは $3\beta$ -OH以外の構造には、それ程強い選択性は無いと言える。フィリピンはステロール分子の全体にわたる結合をしており、アンフォテリツンBは $3\beta$ -OHの側に中心を置いた結合をしているのである。ところで、フィリピンのコレステロールとエルゴステロールに対する結合定数は、それぞれ、Bittman's(26)が求めたものの65分の1と340分の1であるが、彼らは脂質相と水相の間の結合定数を求めていることを考えれば、値が一致しないのは当然である。脂質二重層内でのポリエー系抗生物質とステロールの結合定数はこの論文で初めて求められた。

コレステロールによつて減少した eggPC の

脂質二重層の流動性は、加えたフィリピンの濃度に従って回復することが、PC\*を用いて初めて確認された(図19)。脂肪酸スピンプローブ[35]と水素の核磁気共鳴[33]では、このコレステロール効果のフィリンによる除去を観察できていなかったため、PC\*を用いたスピンプローブ法が有効な実験法となった。一方、アンフォテリシンBでは除去でなく、むしろ、流動性がさらに減少したが、これはフォスファチジルセリン(phosphatidylserine)とコレステロールのヴェツワルで蛍光ラベルの偏光解消で観察した結果[32]と一致している。フィリンとアンフォテリシンBは、どちらも、脂質二重層内でステロールと複合体を作っているが、その複合体が周囲の燐脂質に与える影響は、このように異なっている。つまり、これらの複合体はフィリンとアンフォテリシンBでは違った形で作られ存在していることが、この実験から示唆される。

次に、脂質二重層の相変化がポリエン系抗

生物質とステロールの相互作用にどのように影響するかを調べた実験でも、フィリピンとアンフォテリシンBで差があることが示された。液晶相から固相への転移に伴い、フィリピンとEASPの結合は急に増加するのに対して、アンフォテリシンBとの結合はそれ程増加しない(図25)。一方、ポリエー系抗生物質がコレステロールの様な相転移に対する二重効果を示すかを調べたが、DEPCのリポゾームに対するフィリピンとDPPCのリポゾームに対するアンフォテリシンBは、この効果を示さなかった。また、示差熱分析でも示されないことが報告されている[9,8,10]。つまり、相転移に伴う磷脂質分子間の相互作用に、ポリエー系抗生物質分子は影響しえないのである。そのため、ポリエー系抗生物質分子は固相への相転移が起こると、DEPC相から排除されてEASPと結合するようになると思われる。このときの、フィリピンとアンフォテリシンBのDEPC相からの排除され易さの差が、結合

した EASP の増加量に差がある原因となつてゐると思われる。

相転移に伴う複合体の運動性については、その ESR スペクトルの最大分離幅で調べた (図 26)。液晶相では、フィリピンまたはアンフォテリニン B と結合してゐる EASP は、等しい最大分離幅を与え、同様な運動性を持つことが示された。同一の温度では、脂質二重層の粘度 (流動性) は等しいから、この両者の複合体は、ほぼ等しい有効半径を持つ大きさであると考えられる。液晶相から固相に転移すると、アンフォテリニン B との複合体では、最大分離幅の増加はわずかであるが、フィリピンとの複合体では急激に増加する。これは、フィリピンとの複合体は固相で有効半径の大きな形に変化したことを示唆してゐる。このことは、de Kruijff と Demel が提唱したモデル (61) を支持してゐる。彼らは、アンフォテリニン B とコレステロールが 1 分子ずつで作った複合体がさらに 8 個集まって、内

径が8オングストロームの親水性の穴を持った構造を脂質二重層のそれやれの層に作ると述べており、また、フィリピンはコレステロールと一分子ずつで作った複合体が多数集まって、脂質二重層の中央に直径200から300オングストロームの集合体を作ると述べている。EASPのフィリピンに対する結合定数はコレステロールと比較するとかなり小さいので、固相への相転移が起こって、DEPC相からの排除による複合体量の増加が生じて、初めて、大きな集合体を形成するようになったと考えられる。egg PCとコレステロールよりなるリポゾームのポリエーテル系抗生物質による流動性の変化も、この考え方に沿って、次のように説明できる。フィリピンは脂質二重層中のコレステロールと1対1の複合体を作った後、それがさるに多数集まって脂質二重層の中間に大きな集合体を形成することで、コレステロールが脂質二重層から除去された形になり、流動性が回復する。一方、アンフォテリ

ツンBはコレステロールと1対1の複合体を作り、その8個が脂質二重層のそれぞれの層で集合体を作っており、その集合体は依然として脂質二重層の流動性に影響して、むしろさらに減少させていると理解される。アンフォテリツンBが作るこの集合体はかなり安定していると考えられるが[29]、フィリポンの複合体が作る集合体は脂質相の状態の影響を受けると考えられ、実際に、電子顕微鏡による観察でも、その大きさは、150オングストロームから300オングストロームのものまでが発見されている。

示差熱分析計では、コレステロールによって減少した相転移に伴う磷脂質の熱吸収がポリエー系抗生物質によって回復するかどうか調べられている[9,8,10]。このとき、固相ではポリエー系抗生物質が磷脂質相から排除される効果によって、液晶相とは異なるポリエー系抗生物質とコレステロールの相互作用が含まれていることを考慮しなければならぬ。

ことをこの論文は明るかにした。それでも、フィリピンは完全に相転移に伴う熱吸収を回復したが、アンフォテリシンBは部分的にしか回復しなかった事実[10]は、この論文の結果とはよく一致している。

以上、この論文では、ステロイドスピンプローブ(特に, EASP)を用いて、ポリエー系抗生物質とステロールの相互作用について、分子レベルでの新しい知見を人工膜系で得ることができた。今後は、この研究を他のポリエー系抗生物質について拡張することと、生体膜の系へ応用することを考えて、すでに、実験の一部は開始されている。

## 謝辞

この論文をまとめるにあたり、著者の研究の指導と助言を頂いた、大西俊一教授に感謝致します。また、いろいろな点で御協力頂いた、大西研究室の諸氏に感謝致します。

著者と共同して研究にあたりれた 野沢義則博士、前田豊三博士、飯田久也博士、福嶋弘文博士ならびに小林はな子博士には、ここに御名前を記して、感謝の意を表します。



## 参考文献

1. Nozawa, Y., Iida, H., Fukushima, H., Ohki, K. and Ohnishi, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 367, 134-147
2. 葛西令子, 関谷孝, 岡野幸雄, 長尾清治, 大木和夫, 大西俊一, 野沢義則 (1977) *膜* 2, 301-312
3. Iida, H., Maeda, T., Ohki, K., Nozawa, Y. and Ohnishi, S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* (印刷中)
4. Hazen, E.L. and Brown, R. (1951) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 93-97
5. Gottlieb, D., Carte, H.E., Stoneker, J.H. and Amman, A. (1958) *Science* 128, 361
6. Lampen, J.O., Arnow, P.M. and Satterman, R.S. (1960) *J. Bacteriol.* 80, 200-206
7. Norman, A.W., Demel, R.A., de Kruyft, B. and van Deenen, L.L.M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1918-1929
8. Norman, A.W., Demel, R.A., de Kruyft, B., Geurts van Kessel, W.S.M. and van Deenen,

- L.L.M. (1972) Biochim. Biophys. Acta 290, 1-14
9. Bittman, R., Chen, W.C. and Anderson, O.R.  
(1974) Biochemistry 13, 1364-1373
  10. de Kruijff, B., Gerritsen, W.J., Oerlemans, A., van Dijck, P.W.M., Demel, R.A. and van Deenen, L.L.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 339, 44-56
  11. de Kruijff, B., Gerritsen, W.J., Oerlemans, A., Demel, R.A. and van Deenen, L.L.M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 339, 30-43
  12. Weissman, G. and Sessa, G. (1966) J. Biol. Chem. 242, 616-625
  13. Kinsky, S.C., Haxby, J., Kinsky, C.B., Demel, R.A. and van Deenen, L.L.M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 152, 174-185
  14. HsuChen, C.-C. and Feingold, D.S. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 972-978
  15. HsuChen, C.-C. and Feingold, D.S. (1973) Antimicrob. Ag. Chemother. 4, 309-315
  16. Spielvogel, A.M. and Norman, A.W. (1975) Arch.

- Biochem. Biophys. 167, 335-344
17. Deuticke, B., Kim, M. and Zöllner, C. (1973)  
Biochim. Biophys. Acta 318, 345-359
18. Verkleij, A.J., de Kruijff, B., Gerritsen, W.F.,  
Demel, R.A., van Deenen, L.L.M. and Ververgaert,  
P.H.J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 291, 577-581
19. Tillack, T.W. and Kinsky, S.C. (1973) Biochim.  
Biophys. Acta 323, 43-54
20. Nozawa, Y., Kitajima, Y., Sekiya, T. and  
Ito, Y. (1974) Biochim. Biophys. Acta 367,  
32-38
21. Kitajima, Y., Sekiya, T. and Nozawa, Y. (1976)  
Biochim. Biophys. Acta 445, 452-465
22. Demel, R.A., van Deenen, L.L.M. and Kinsky,  
S.C. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2749-2753
23. Schroeder, F., Holland, J.F. and Bieber, L.L.  
(1972) Biochemistry 11, 3105-3111
24. Strom, R., Critò, C. and Bozzi, A. (1973) Biophys.  
J. 13, 568-580
25. Bittman, R., and Fischkoff, S.A. (1972) Proc. Nat.

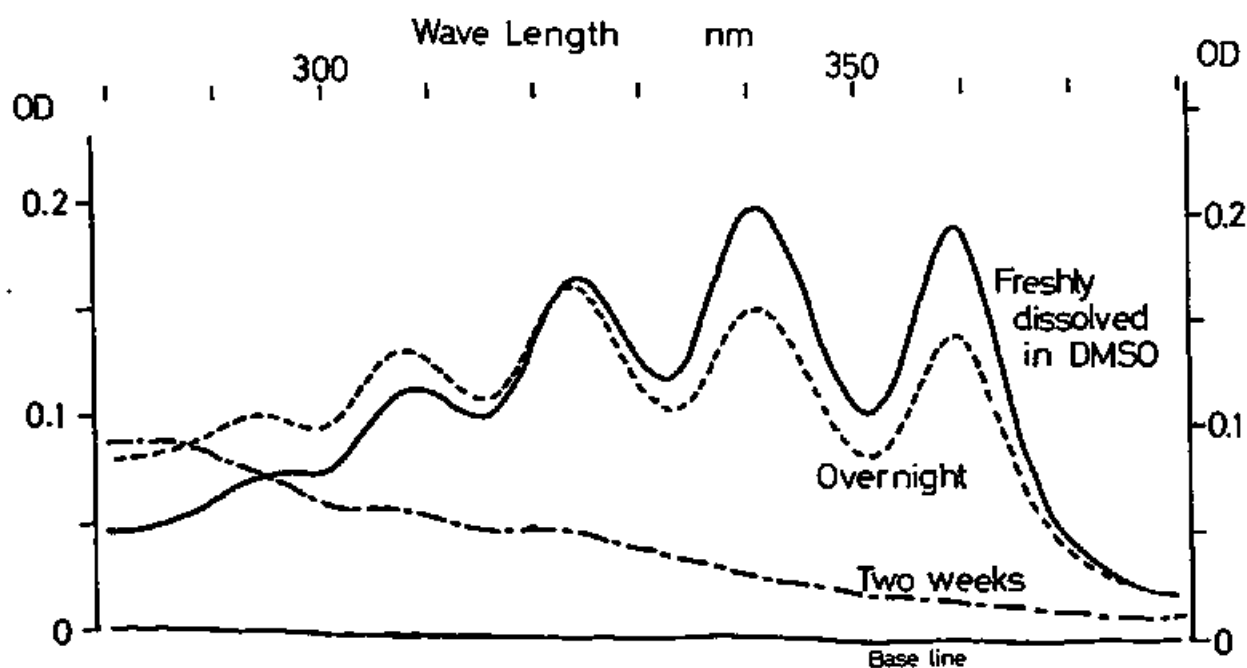
- Acad. Sci. USA 69, 3995-3999
26. Bittman, R. and Chen, W.C. and Blau, L. (1974) Biochemistry 13, 1374-1379
  27. Hladky, S.B. and Haydon, D.A. (1970) Nature 225, 451-453
  28. Marty, A. and Finkelstein, A. (1975) J. Gen. Physiol. 65, 515-526
  29. Ermishkin, L.N., Kasumov, Kh.M. and Potzeluyev, V.M. (1976) Nature 262, 698-699
  30. Ermishkin, L.N., Kasumov, Kh.M. and Potseluyev, V.M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 470, 357-367
  31. Norman, A.W., Spielvogel, A.M. and Wong, R.G. (1976) Adv. Lipid Res. 14, 127-170
  32. Feinstein, M.B., Fernandez, S.M. and Sha'ati, R.I. (1975) Biochim. Biophys. Acta 413, 354-370
  33. Gent, M.P.N. and Prestegard, J.H. (1976) Biochim. Biophys. Acta 426, 17-30
  34. Demel, R.A. and de Kruyft, B. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457, 109-132
  35. Flick, C. and Gelerinter, E. (1977) Chem. Phys.

Lipids 18, 62-72

36. Bergy, M.E. and Eble, T.E. (1968) Biochemistry 7, 653-659
37. Sessa, G. and Weissman, G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4364-4371
38. Hsu Chen, C.-C. and Feingold, D.S. (1973) Antimicrob. Ag. Chemother. 4, 316-319
39. Robles, E.C. and van den Berg, D. (1969) Biochim. Biophys. Acta 187, 520-526
40. Singleton, W.S., Gray, M.S., Brown, W.L. and White, J.L. (1965) J. Am. Oil. Chem. Soc. 42, 53-56
41. Keana, J.F.W., Keana, S.B. and Beetham, D. (1967) J. Am. Chem. Soc. 89, 3055-3056
42. Hubbel, W.L. and McConnell, H.M. (1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 314-326
43. Hauser, H.O. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1049-1055
44. Shimshick, E.J. and McConnell, H.M. (1973) Biochemistry 12, 2351-2360

45. Kivelson, D. (1960) *J. Chem. Phys.* 33, 1094-1106
46. Nozawa, Y. and Thompson, G. A. (1971) *J. Cell Biol.* 49, 712-721
47. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 31, 911-917
48. Bartlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 466-468
49. Lee, A. G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 472, 237-281
50. Ranck, J. L., Mateu, L., Sadler, D. M., Tardieu, A., Gulik-Krzywicki, T. and Luzzati, V. (1974) *J. Mol. Biol.* 85, 249-277
51. Papahadjopoulos, D. and Miller, N. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 135, 624-638
52. Huang, C. h. (1969) *Biochemistry* 8, 344-351
53. Marsh, D., Watts, A. and Kowles, P. F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 465, 500-514
54. Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R. and van Deenen, L. L. M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 255, 311-320
55. Demel, R. A., Bruckdorfer, K. R. and van Deenen,

- L.L.M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 255, 321-330
56. de Kruijff, B., Demel, R.A. and van Deenen, L.L.M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 255, 331-347
57. Hsia, J.C., Long, R.A., Hruska, F.E. and Gesser, H.D. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 290, 22-31
58. de Kruijff, B., Cullis, P.R. and Radda, G.K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 436, 729-740
59. Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W. and Schaffner, C.P. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93, 4560-4564
60. Haslam, R.M. and Klyne, W. (1953) *Biochem. J.* 55, 340-346
61. de Kruijff, B. and Demel, R.A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 339, 57-70



ABSORPTION SPECTRA OF FILIPIN

図1. DMSOに溶解させたフィリピンの50 mM 溶液を, (a)溶解直後(実線), (b)一晩の間、冷凍庫に保存(破線), (c)二週間、冷凍庫に保存(一点鎖線)の状態から5 $\mu$ lを取り、20 mlの緩衝液(150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7.5)に加えて、22度で280 nmから380 nmの吸収スペクトルを測定した。ユニオン技研のRA-112高感度分光光度計で、スリット幅1.00 mm, 掃引時間65秒で測定した。



## PHASE TRANSITION IN LIPOSOMES OF DEPC

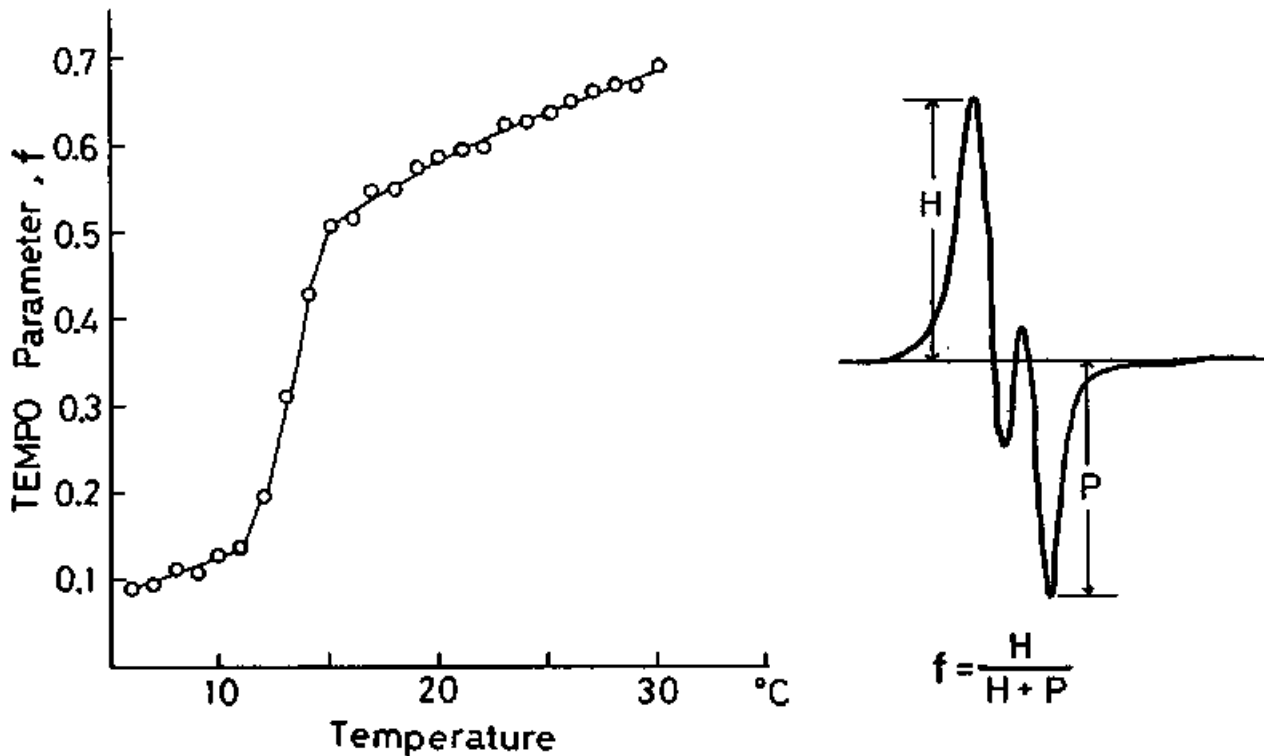
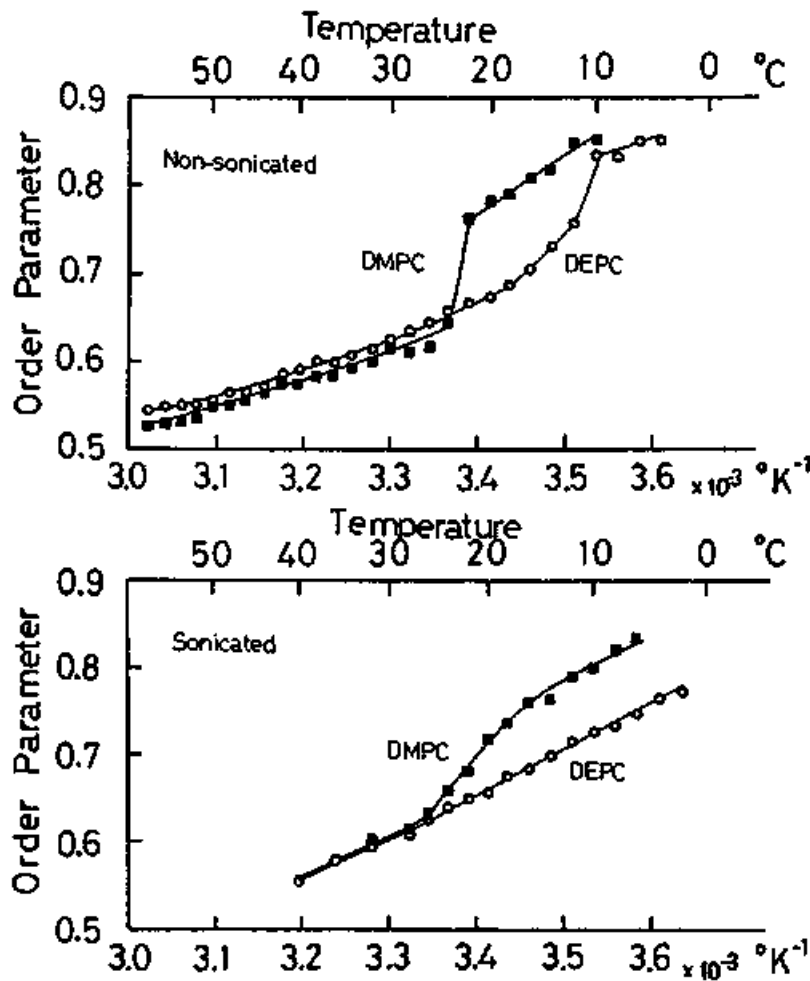


図 2. 4mg の DEPC に 0.1ml の緩衝液 (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.5) と 5μl の 5mM Tempo 溶液, それにガラス玉を加え, 40度で 30秒間, 攪拌する。これを 15,000 × g, 15分, 10度で遠心した沈渣を ESR で各温度で測定する。Tempo パラメーター, f, は図の右に示すように。水相のシグナルの高さ, P, と脂質相のシグナルの高さ, H, より  $f = \frac{H}{H+P}$  の式で計算した (44)。



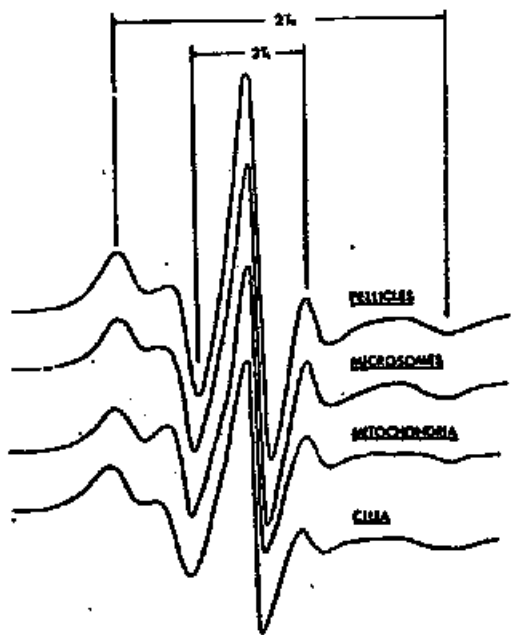
FLUIDITY CHANGE IN LIPID BILAYER

図 3 .

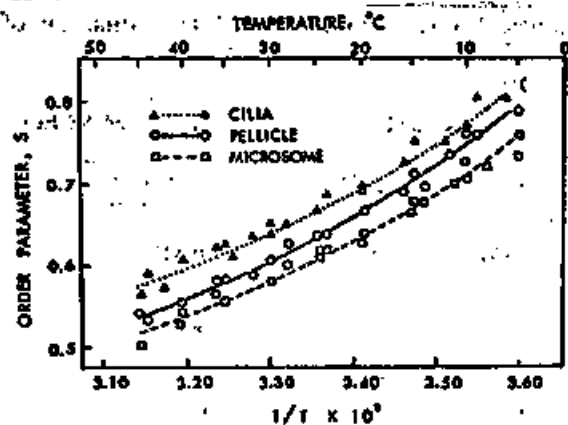
(上図) それぞれのベンゼン溶液から、DMPCまたはDEPCの2mgと5SAL 10mgを取り、ベンゼンを気化させて取り除き、0.1mlの緩衝液(150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.5)と数個

のガラス玉を加えて、40度で攪拌しりホゾームに調製する。(下図) 4mgの燐脂質と20mgの5SALを0.2mlの緩衝液中でりホゾームに調製した後、窒素気流下、室温で2分間の超音波処理をし、ヴェツワルに調製する。

0.5度/分で、温度を変えてESR測定をする。



The ESR spectra of different *Tetrahymena* membrane fractions labeled with 5-nitroxide stearate. The membrane fractions were isolated from cells grown at 25 °C. All spectra measured at 22 °C.



The order parameter of 5-nitroxide stearate label in various *Tetrahymena* membranes as a function of the reciprocal of the absolute temperature. Membrane fractions were isolated from cells grown at 25 °C.

図 4.

25度で培養したテトラヒメナ細胞より、各膜分画を分離する。スピコンラベルは、SSALの薄膜を張った試験管にそれぞれ膜分画を加え、29度で

5分間のインキュベーションをすることで行った。オーダーパラメータは、上のスペクトル中に示したように、 $2T_1$  と  $2T_2$  を測定して、 $T_1$  と  $T_2$  を求め、 $S = \frac{T_1 - T_2}{2T_1}$  として計算した。

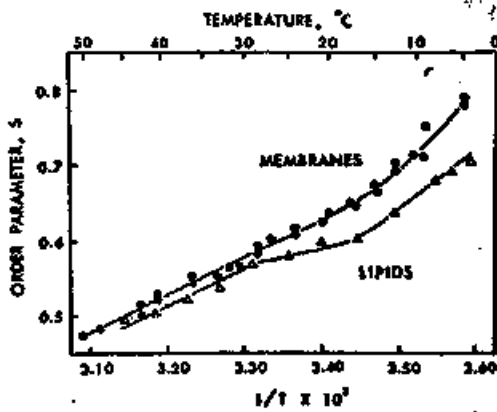


図 5

15度で培養したテトラヒメナ細胞より，細胞外膜の分画

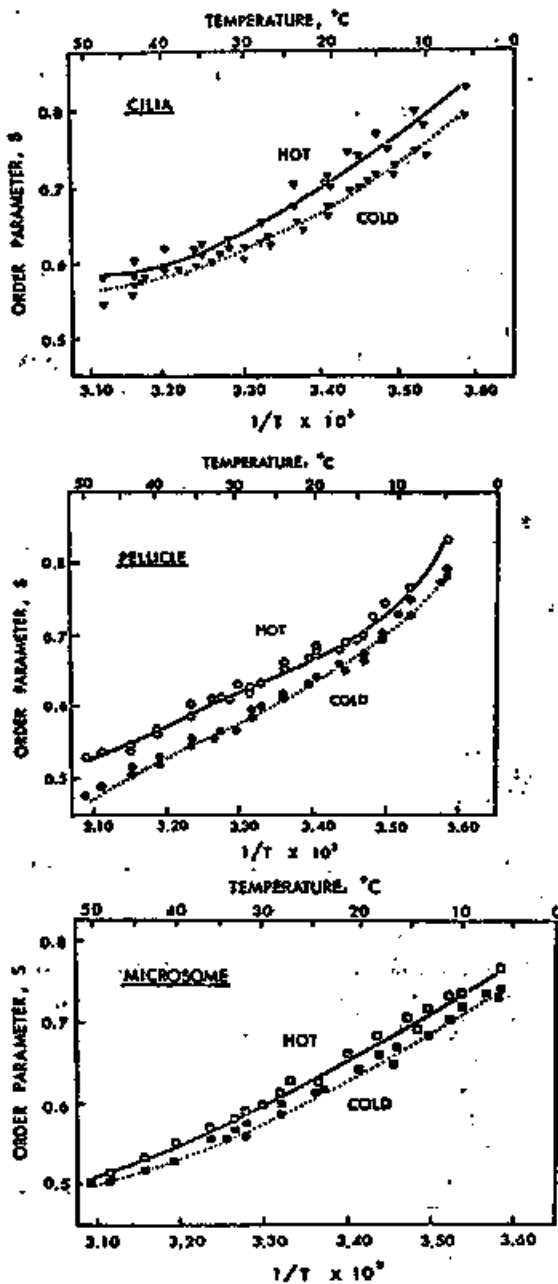
The order parameter of 5-nitrooxide stearate label in the pellicle membrane and in aqueous dispersion of lipids extracted from the membranes.

を単離する。これを二つに分けて，一方はそのまま，5SALで図4に述べたのと同様にしてスピンラベルをする。もう一方は，脂質を抽出し，5SALを加えてリホゾームに調製する。これらの試料を，各温度でESR測定する。

FATTY ACID COMPOSITION IN LIPIDS OF WHOLE CELLS AND SUBCELLULAR FRACTIONS FROM *T. PYRIFORMIS*

Fatty acids	Percentage fatty acid composition in total lipids of:																	
	Whole cells			Cilia			Pellicles			Mitochondria			Microsomes			Post-microsomal supernatant		
	(°C):	15	25	34	15	25	34	15	25	34	15	25	34	15	25	34	15	25
C <sub>12:0</sub>	1.8	1.9	2.7	1.2	0.8	1.7	2.8	3.1	3.3	1.2	1.2	1.8	1.4	1.5	1.8	2.3	2.0	5.0
C <sub>14:0</sub>	4.9	5.2	5.6	4.9	3.1	4.0	6.4	6.5	6.0	4.0	4.0	4.4	5.2	5.2	6.0	6.0	6.4	8.0
C <sub>16:0</sub>	5.5	7.9	10.2	8.0	5.7	11.8	8.3	10.6	13.0	5.9	7.3	8.6	5.7	7.1	11.2	7.0	8.6	12.6
C <sub>16:1</sub>	12.6	10.8	6.2	10.6	5.5	6.5	13.8	11.4	6.9	11.4	9.2	6.7	12.3	11.9	8.2	15.7	13.6	11.8
C <sub>18:0</sub>	0.7	0.6	2.7	1.4	0.8	3.3	0.8	0.5	1.8	0.7	0.8	2.8	0.7	0.8	1.5	1.2	1.6	9.3
C <sub>18:1</sub>	7.6	8.6	13.1	7.6	6.1	11.0	8.9	8.6	14.0	8.0	7.1	10.9	7.4	7.9	13.2	11.7	11.5	15.1
C <sub>19:1</sub>	19.9	19.8	17.7	16.0	16.6	16.1	16.0	16.8	14.9	20.2	21.4	20.7	20.4	21.0	17.5	16.5	18.0	11.8
C <sub>20:0</sub>	32.2	33.6	30.2	31.0	43.2	30.0	26.0	29.2	25.4	34.6	38.3	36.2	33.6	34.1	28.4	24.2	26.0	14.4
<i>ΣU/ΣS</i>	5.6	4.7	3.2	4.2	6.9	3.2	3.5	3.3	2.5	6.3	5.7	4.2	5.7	5.4	3.2	4.1	3.7	1.5

表1. テトラヒメナ細胞を、15度、25度、34度の異なる温度で、それぞれ培養し、それから各膜分画を分離する。この膜分画より脂質を抽出し、さらに燐脂質を分離する。燐脂質の脂肪酸側鎖はメチルエステル化し、ガス-液体クロマトグラフィーで、各脂肪酸の量を定量しそれを百分率で表わす。全不飽和脂肪酸と全飽和脂肪酸の量比は  $\Sigma U / \Sigma S$  として表わしてある。



The order parameter of 5-nitroxide stearate label incorporated in cilia (a), pellicles (b) and microsomes (c). The hot or cold membrane was isolated from cells grown at the shifted temperatures of 34°C or 15°C.

図 6.

テトラヒメ  
ナ細胞は、  
高温(34度)と  
低温(15度)の  
異なる温度  
で培養され  
た。これ  
らの細胞か  
ら、各膜分  
画を分離し  
た。スピ  
ンラベルは  
5SALの薄層  
を張った試

験管中で、それぞれの膜分画を37度、5分間  
インキュベーションすることで行った。各  
温度でESR測定をし、そのスペクトルより、  
Sを求めた。

## STRUCTURE OF STEROID SPIN PROBES AND STEROLS

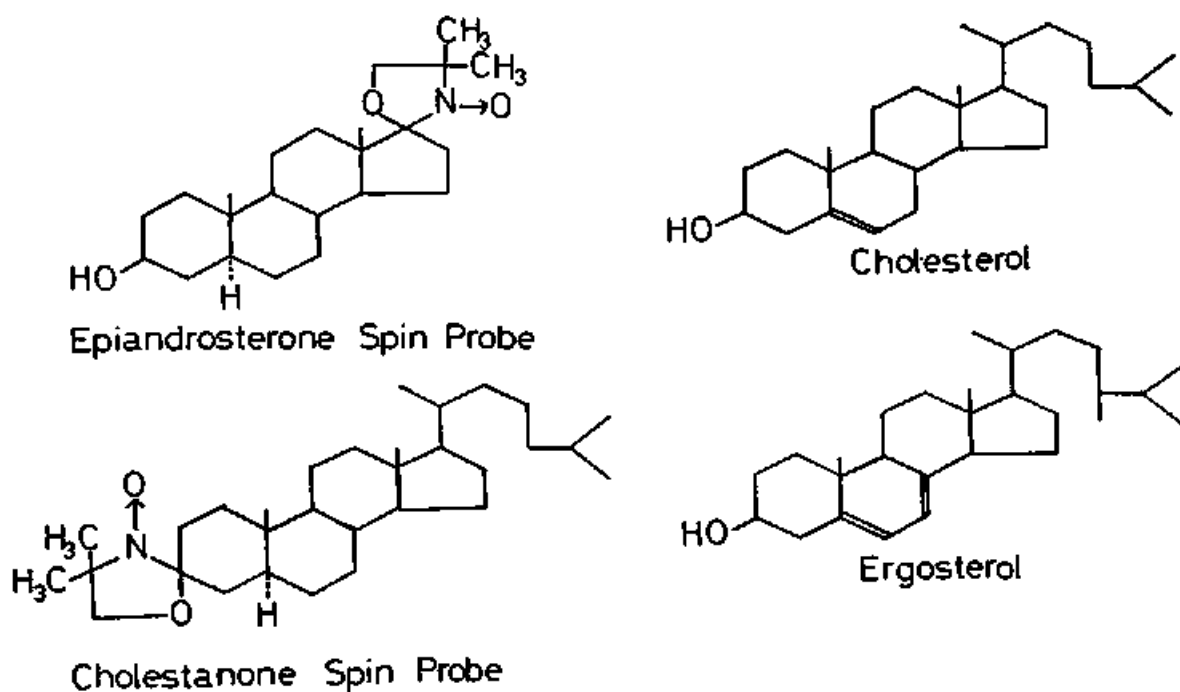
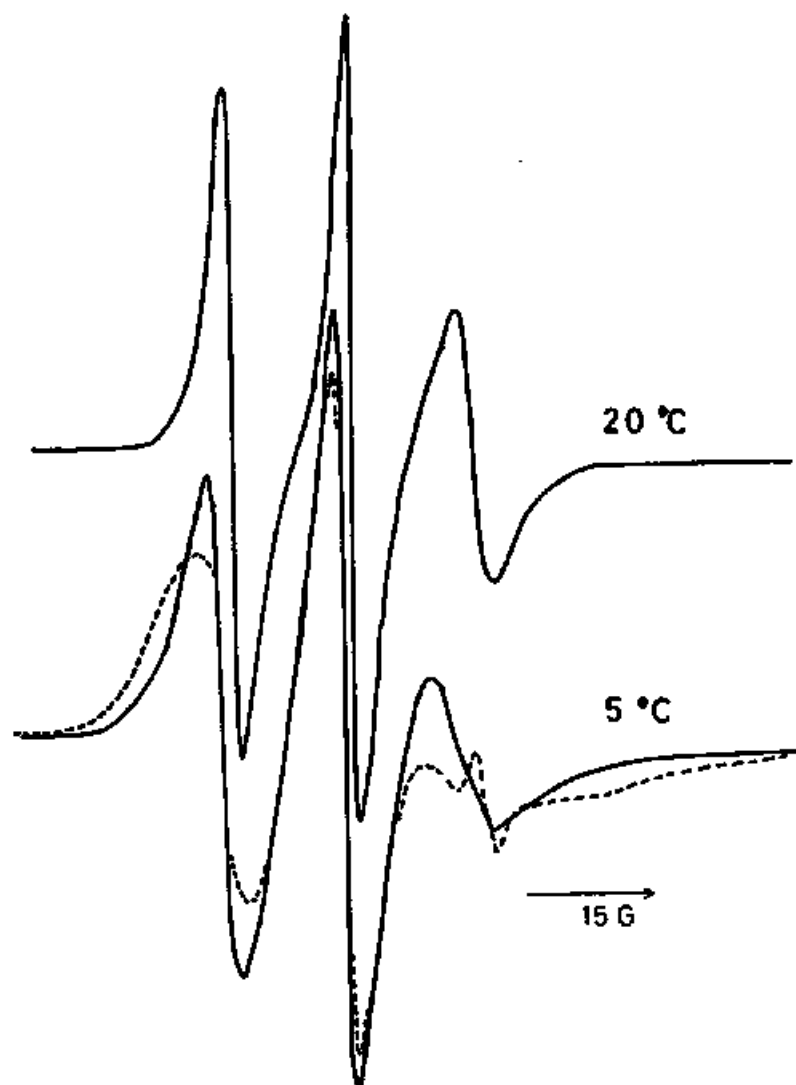


図7. EASPは、 $3\beta$ の水酸基を持ち、窒素原子の $\pi$ 軌道は分子の長軸に対して、約60度の角度をなしている。CSPは、炭素の17の位置に側鎖を持ち、窒素原子の $\pi$ 軌道は分子の長軸に対して90度の角度をなしている。

エルゴステロールは、ステロイド骨格の二重結合と側鎖のメチル基をコレステロールより一つ多く持っている。

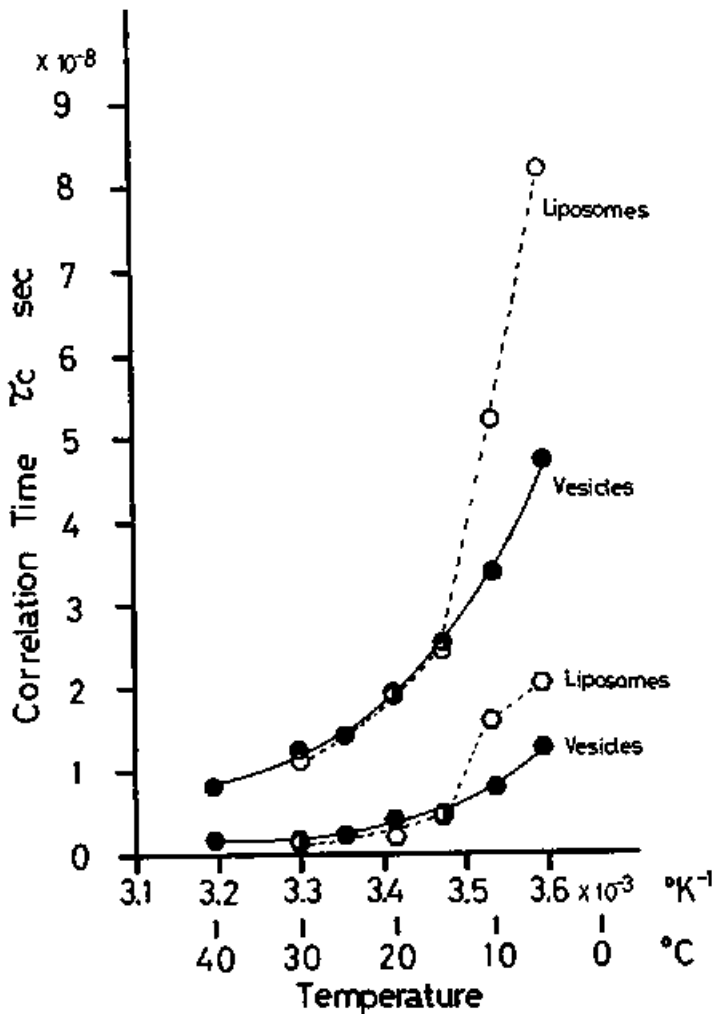


ESR SPECTRA OF EPIANDROSTERONE SPIN  
PROBE IN DEPC BILAYER ABOVE & BELOW  $T_m$

図 8  
10mgの DEPC  
と 50 $\mu$ gの EASP  
をベンゼン溶  
液から取り、  
溶媒を気化し  
て取り除いた  
後、1mlの緩衝  
液 (150mM NaCl,  
50 mM Tris-HCl,  
pH 7.5) とガラ  
ス玉を加えて  
40度で攪拌し  
りホゾームに

調製する(破線)。これを窒素気流下、0度、  
3分間、直径7mm振動子、レベル40(海上電  
機)の20kHzの超音波菌体破砕機)で超音波処  
理して、ガエツワルに調製する(実線)。ESR  
測定は、20度、5度とも、その温度で15分以  
上経過してから行った。





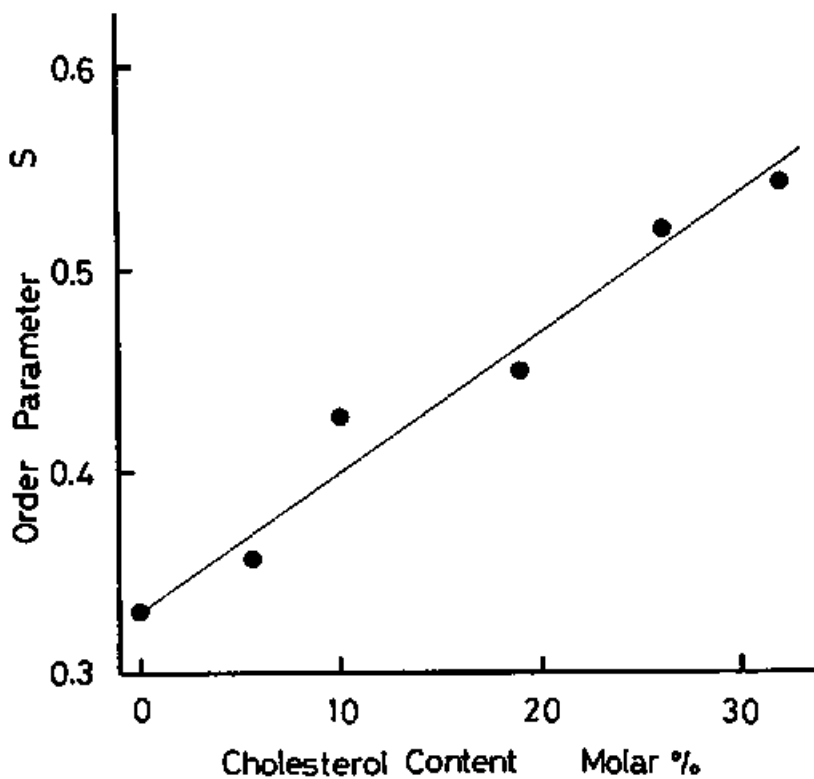
CORRELATION TIME OF EPIANDROSTERONE  
SPIN PROBE IN DEPC VESICLES AND  
LIPOSOMES

図 9

図 8 に述べたのと同じようにして調製したりポゾームとゲツクルを各温度で、ESR 測定した。回転相関時間、 $\tau_c$  は、ESR スペクトルの低磁場と中央のピークより(図の下の

2つ) と高磁場と中央のピークより(図の上の2つ) 求めた。 $\tau_c$  は、媒体の粘性 $\eta$  と分子の有効半径 $r$  とに、次の関係がある。

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT}$$



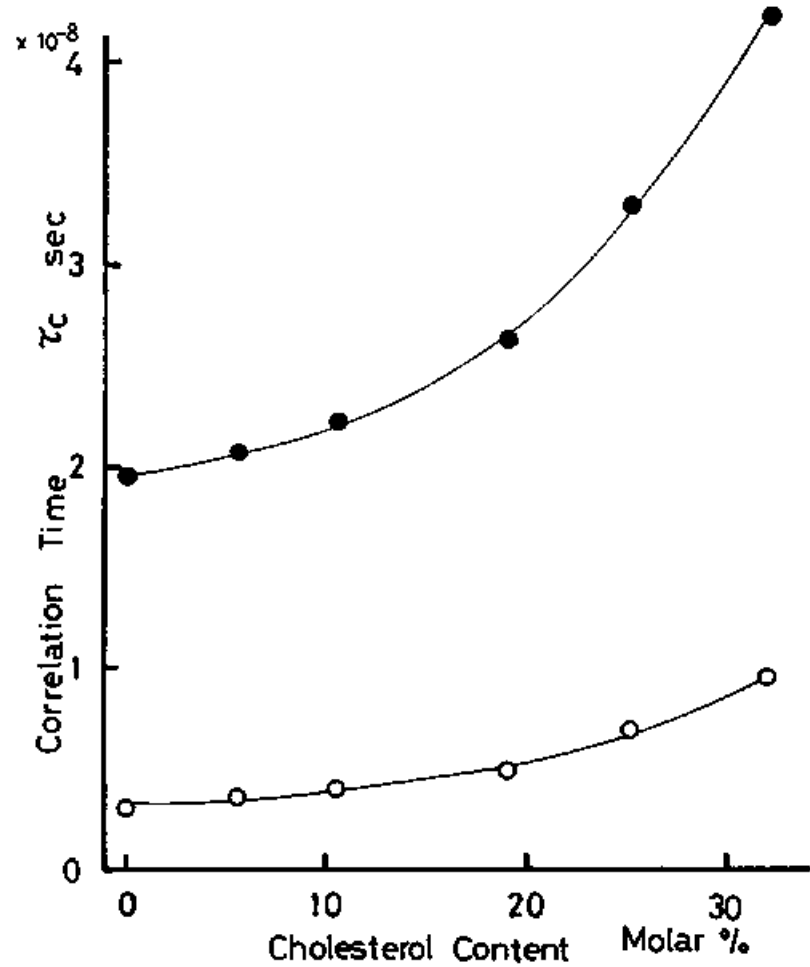
CHANGE OF ORDER PARAMETER  
IN DEPC VESICLES BY CHOLE-  
STEROL CONTENT

図 10

3mgのDEPCと  
30μgのPC\*に  
対して, 0, 5.6,  
10.0, 19.0, 26.1,  
33.0 モルペー  
セントのコレ  
ステロールを  
加えたものを  
別々に, 作り  
さるに, それ  
ぞれに 0.3mlの  
緩衝液 (150mM  
NaCl, 50mM Tris

HCl, pH7.5)とガラス玉を加え, 40度で30秒攪  
拌してリポソームに調製する。それを, 室  
温, 窒素気流下で超音波処理して, ガエツワ  
ルに調製する。ESR測定は20度で行い, 次  
の式でオーダーパラメータを計算する[42]。

$$S = \frac{T_{11} - T_{12}}{2T_0}$$

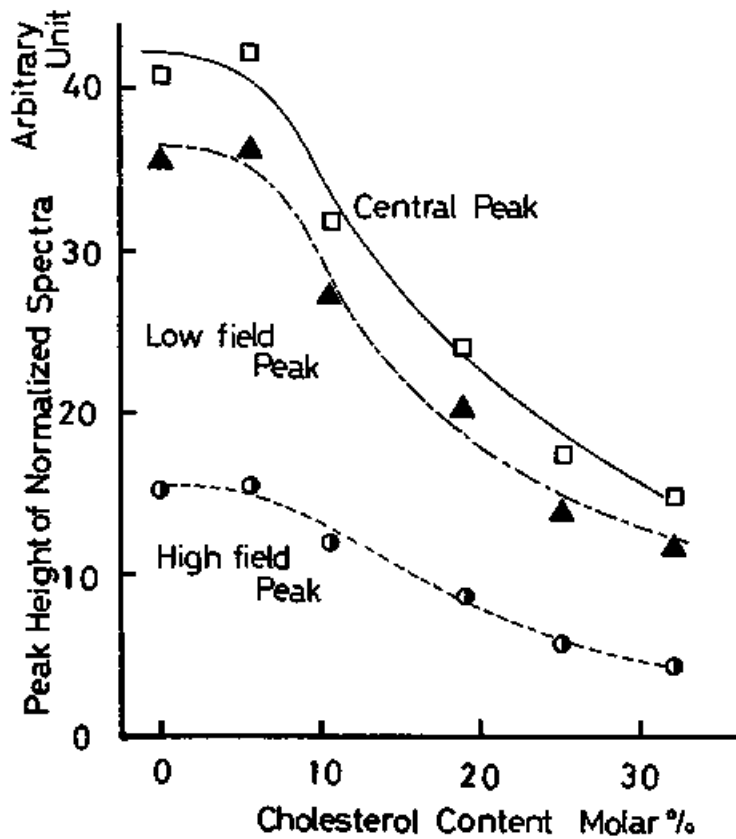


CHANGE OF CORRELATION TIME IN DEPC VESICLES BY CHOLESTEROL CONTENT

図 11

1.8 mg の DEPC  
 × 10 μg の EASP  
 に対して、別  
 々に、0, 5.6,  
 10.6, 19.1, 25.2,  
 32.1 モルパー  
 セントのコレ  
 ステロールを  
 加え、さらに  
 0.2 ml の緩衝液  
 とガラス玉を  
 加えて、40度  
 で攪拌しリポ

15 ゴームに調製する。これを室温で超音波処  
 理し、ガラス玉に調製する。ESR測定は  
 20度で行ない、高磁場と中央のピークから(図  
 の上)と低磁場と中央のピークから(図の下)、  
 $\tau_c$  を求める。



CHANGE OF ESR SPECTRA IN DEPC VESICLES BY CHOLESTEROL CONTENT

図12

試料の調製と ESR測定は図11に述べたのと同じ様にして行う。 ESRスペクトルはコンピューターを用いて積分し、吸収強度を求める。 スペクトルを一定の吸収強度にス

ペクトルを規格化した後、低磁場、中央、高磁場の各ピークの高さを求める。 このとき、ピークの高さと線幅とは、ほぼ、反比例の関係にある。

EFFECT OF CHOLESTEROL ON  
LIPOSOME FLUIDITY  
OF EGG YOLK LECITHIN

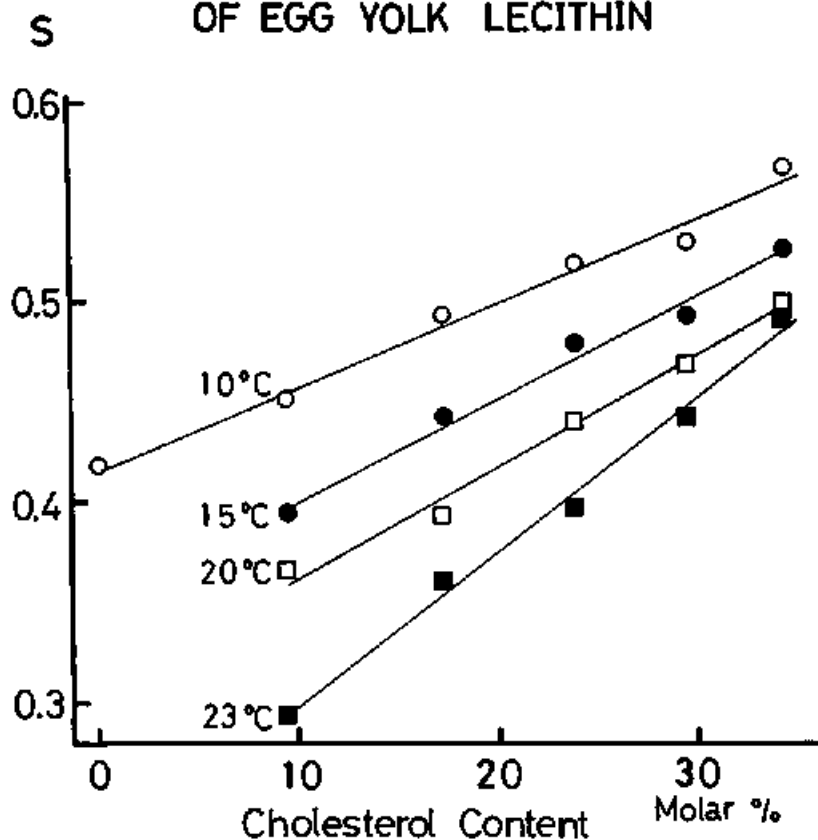


図 13.

2mgの egg PC  
と 20 $\mu$ gの PC\*  
に対して, 別  
々に, 0, 9.4,  
19.2, 23.8, 29.4,  
34.2 モルパー  
セントのコレ  
ステロールを  
加え, さらに  
0.2mlの緩衝液  
(150mM NaCl, 50  
mM Tris-HCl,  
pH 7.5) と ガラ

ス玉を加え, 40度で 30秒間攪拌する。この  
ように調製したリポソームを 10, 15, 20, 23度の  
各温度で ESR測定し, そのスペクトルからオ  
ーダーパラメーター, S, を求めた(42)。

## STRUCTURE OF POLYENE ANTIBIOTICS

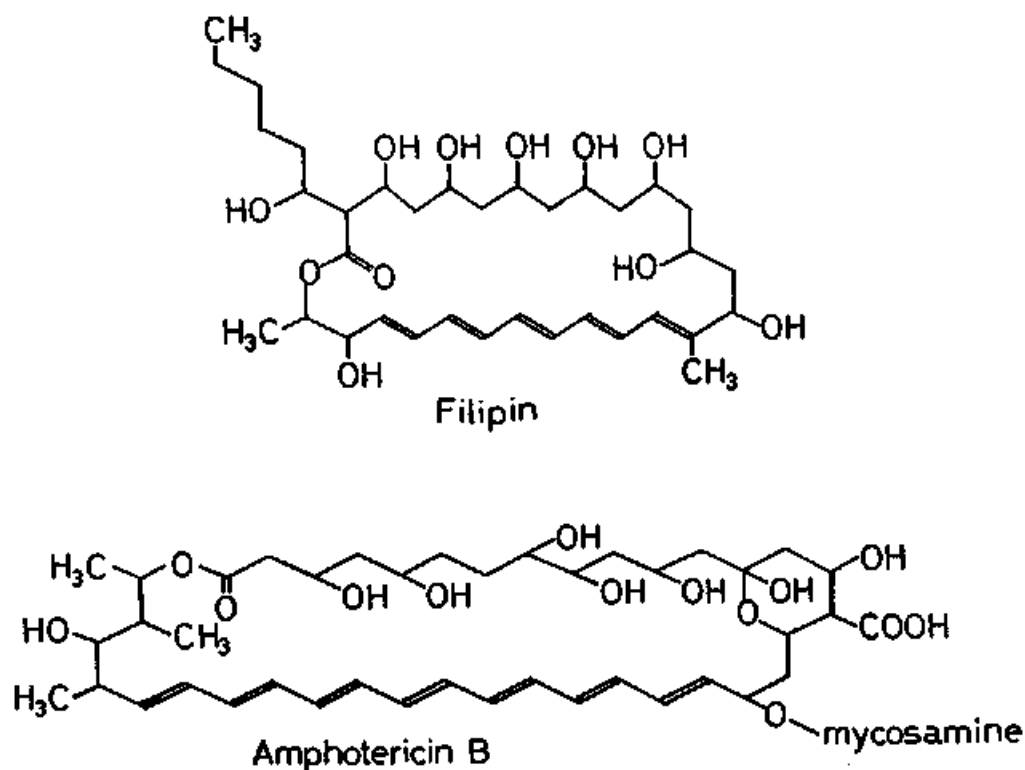


図14. ポリエン系抗生物質はマクロライド環を共通構造として持ち、その片側は水酸基のため親水性であり、反対側は共役二重結合を持ち疎水性である。フィリピンはペンタエン、アンフォテリシンBはヘプタエンであり、それぞれ特有の吸収スペクトルを示す。フィリピンは中性な化合物であり、アンフォテリシンBはカルボキシル基とアミノ基を持つ両性イオン化合物である。後者は脂質二重層の厚さの半分の長さの分子である。

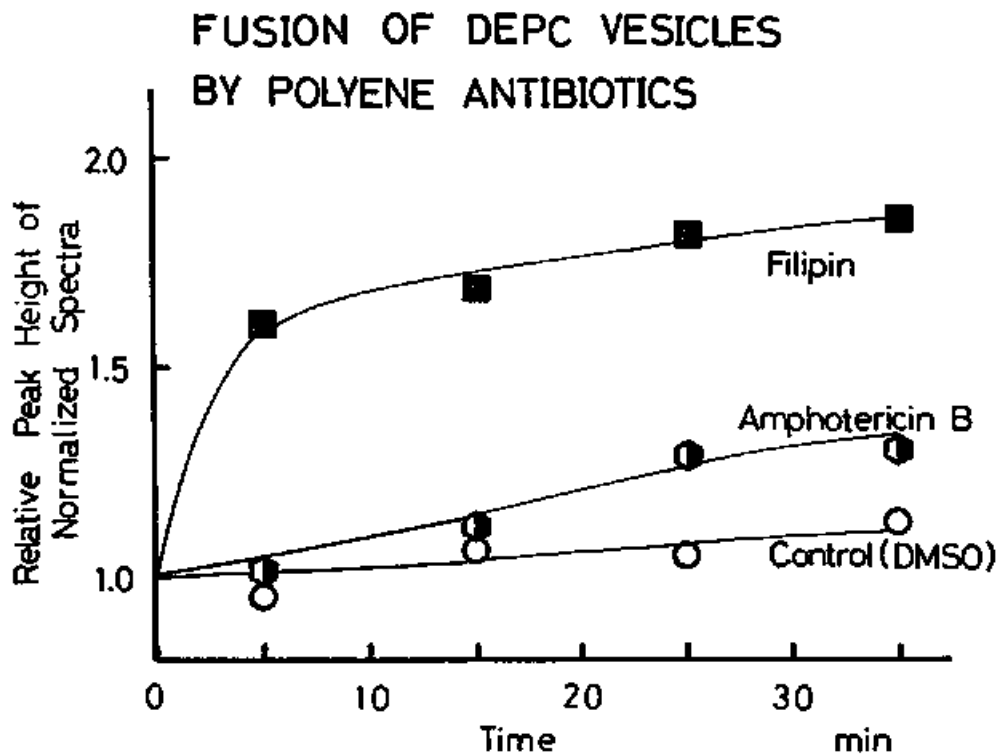


図 15. 2mg の DEPC と 0.5mg の PC\* に 1ml の 緩衝液と、10mg の DEPC に 2ml の 緩衝液 を 加えた もの を、別々に、グエツワル に 調製する。前者の 0.1 ml と 後者の 0.2ml を 20ml の 50mM ホリエン系抗生物質 または DMSO を 混合して、20度で 10分間の 掃引時間で ESR 測定を行う。掃引の中央での 時刻を 測定時刻 とする。測定後、スペクトルの 積分を コンピューターで行い、一定の 吸収強度に 規格化した スペクトルの 中央ピークの高さを 求める。

FUSION OF DEPC-CHOLESTEROL  
VESICLES BY POLYENE ANTIBIOTICS

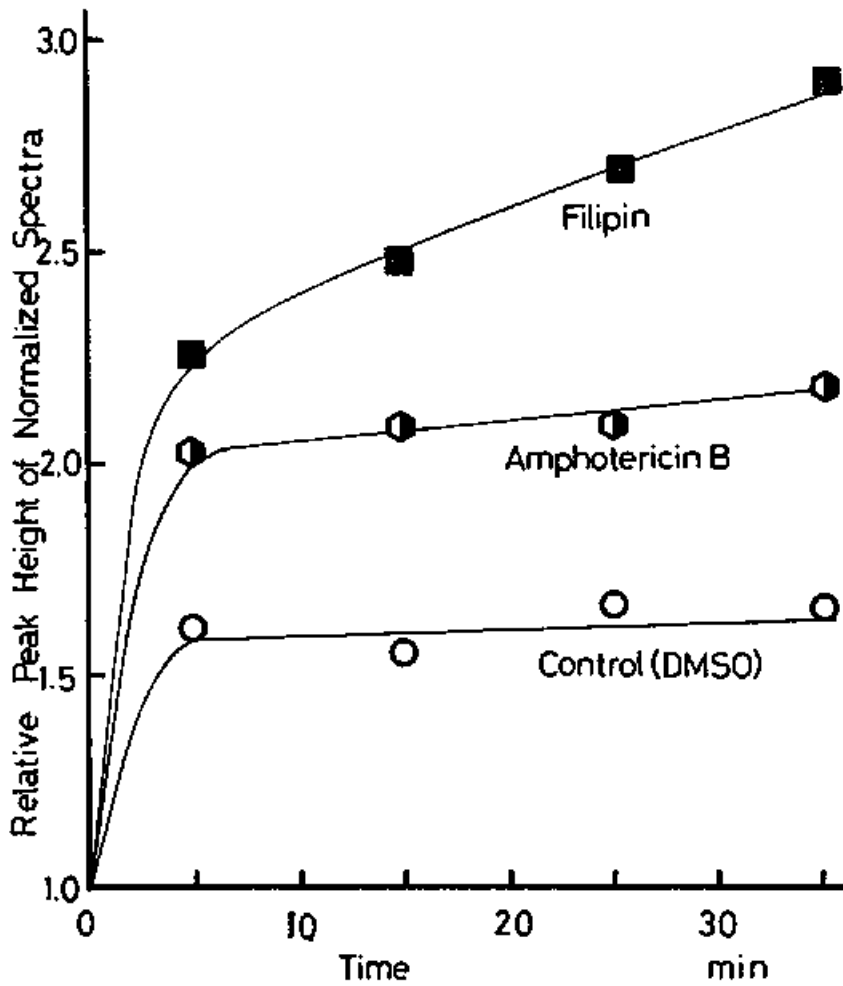
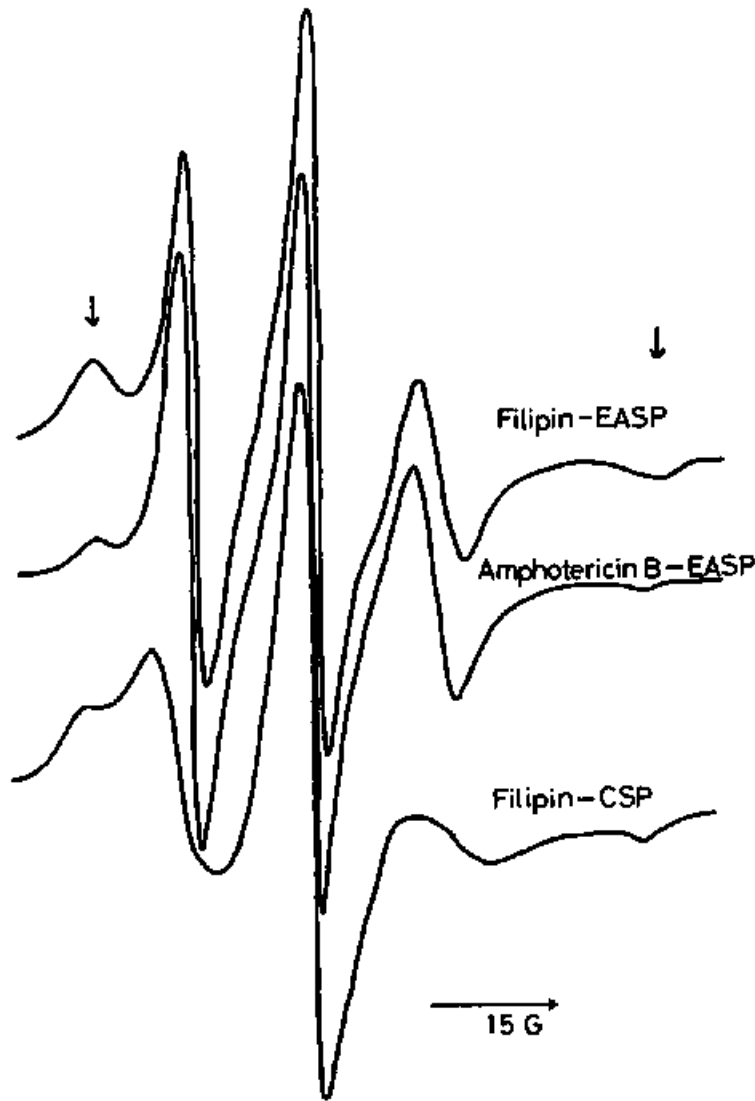


図 16

2mgのDEPC,  
0.4mgのコレス  
テロール, 0.5  
mgのPC\*に1ml  
の緩衝液を(150  
mM NaCl, 50 mM  
Tris-HCl, pH7.5)  
を加えたもの  
と, 10mgのDEPC,  
2mgのコレステ  
ロールに2ml  
の緩衝液を加  
えたものを,

以下は, 図15に述べたのと同じようにして,  
実験を行う。



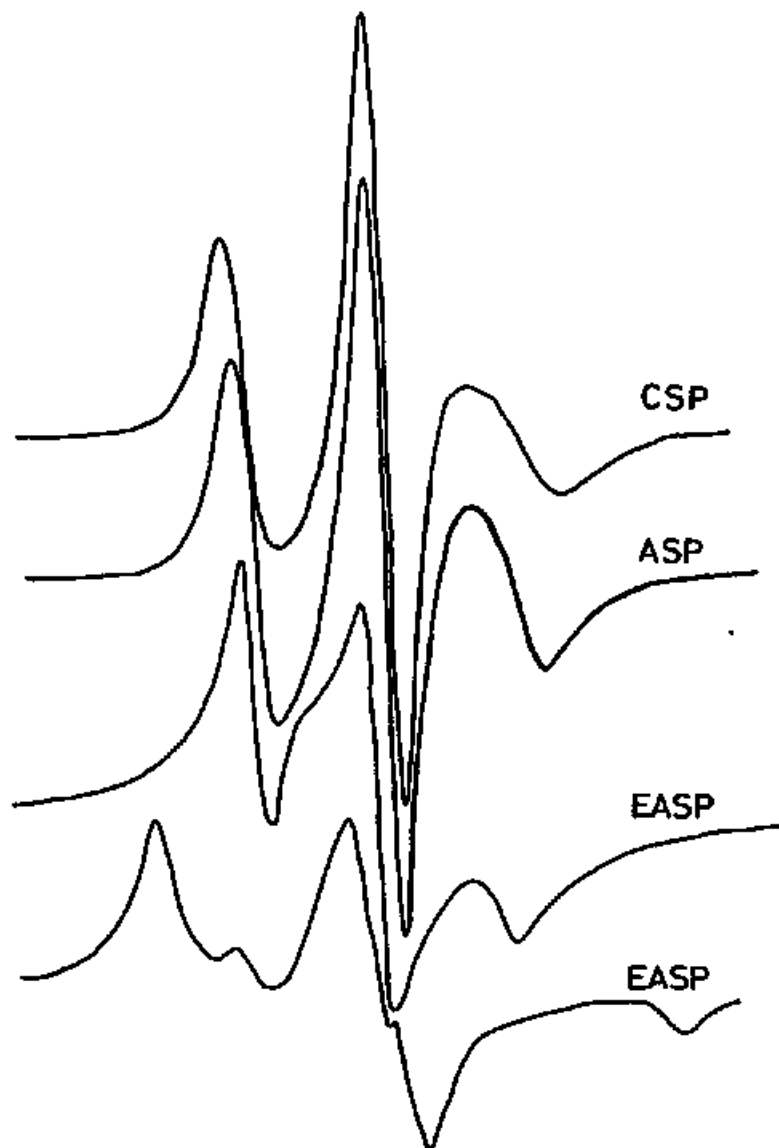


INTERACTION BETWEEN POLYENE ANTIBIOTICS  
AND STEROID SPIN PROBES IN DEPC LIPOSOMES

図 17.

10 mg の DEPC と  
100  $\mu$ g の EASP に  
1 ml の 緩衝液  
(150 mM NaCl, 50  
mM Tris-HCl, pH  
7.5) を加えて  
、ガエツリル  
に調製する。  
この 0.1 ml に 10  
 $\mu$ l の 50 mM ホリ  
エニ系抗生物  
質を加え、20  
度で ESR 測定

を行った (図の上の 2 つ)。 6 mg の DEPC と 88  
 $\mu$ g の CSP に 0.7 ml の 緩衝液を加えて、上と同  
様の調製をする。 この 0.1 ml に 30  $\mu$ l の 50 mM ア  
ンフオテリン B を加えて、20 度で ESR 測定  
を行った (図の最下段)。 図中の ↓印は、相  
互作用している成分を示す。

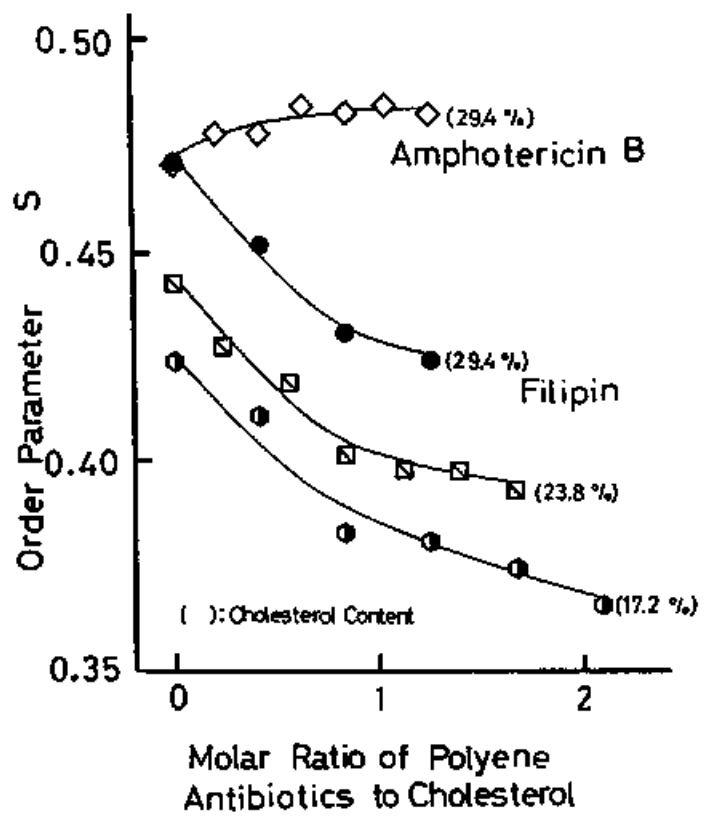


INTERACTION BETWEEN DIGITONIN AND STEROID SPIN PROBES

図 18.

2mgの egg PC, 10 $\mu$ g のステロイド "スピニン" ローブ, 32.9 $\mu$ g のゲキトニンを 0.1ml の緩衝液 (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.5) 中でリポソームに調製し, 23度で ESR 測定を行った (上の 3 つ

のスペクトル)。 12mg の egg PC, 0.99mg のコレステロール, 0.34mg のジセチルフォスフェイト (dicyetyl phosphate) を 0.5ml の緩衝液中でヴェツワルに調製し, その 0.1ml にゲキトニンの 10mM エタノール溶液の 24 $\mu$ l を加えて, 21度で ESR 測定を行った (図の最下段のスペクトル)。



EFFECT OF POLYENE ANTIBIOTICS ON EEG PC-CHOLESTEROL LIPOSOMES

図 19.

20mgの egg PC に 2mg (19.2 モルパーセント), 3mg (23.8モルパーセント), または, 4mg (29.4モルパーセント) のコレステロールを加え、2ml の緩衝液 (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.5) 中で、

リポソームに調製する。この 0.2ml に溶媒の DMSO が 30μl になるように濃度を変えて、ポリエー系抗生物質を加える。それを、30度で 30分間インキュベーションして、ESR測定を 20度で行う。そのスペクトルより、オーダーパラメータを求める(42)。

## ASSOCIATION CONSTANT OF POLYENE ANTIBIOTICS

## WITH STEROL OR STEROID SPIN PROBE AT 20 °C

	Filipin	Amphotericin B
Epiandrosterone spin probe	0.511 ± 0.117 (3)	1.48 ± 0.83 (3)
Cholestanone spin probe	0.08 (1)	
Cholesterol	24.1 ± 11.0 (3)	2.51 ± 1.96 (3)
Ergosterol	1.23 ± 0.23 (3)	1.61 ± 0.57 (3)
	mean ± S.D.	[mM <sup>-1</sup> ] (no. of observations)

表2. 材料と方法に述べたように調製した  
 ゲツワルオホリエン系抗生物質で処理し、  
 遠心した上澄を試料として20度でESR測定す  
 る。上澄中のDEPCのゲツワルは、1モル  
 パーセントのステロイドスピニングと  
 必要左場合は10モルパーセントのステロール  
 を含む。また、10モルパーセント以下のフ  
 イリピンまたは3モルパーセント以下のアン  
 フォテリツンBを含む。詳しくは、本女を  
 参照のこと。

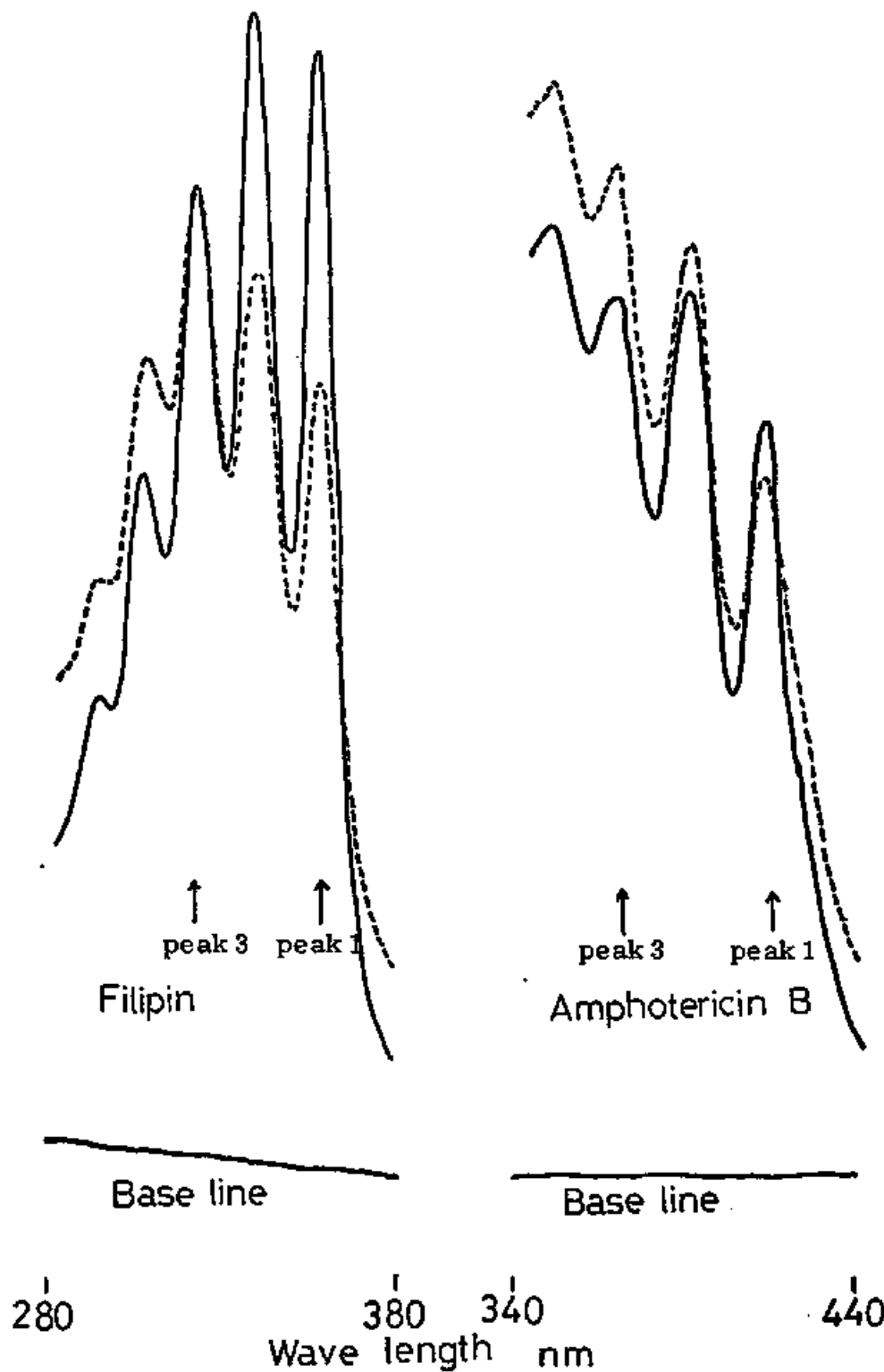


図 20.

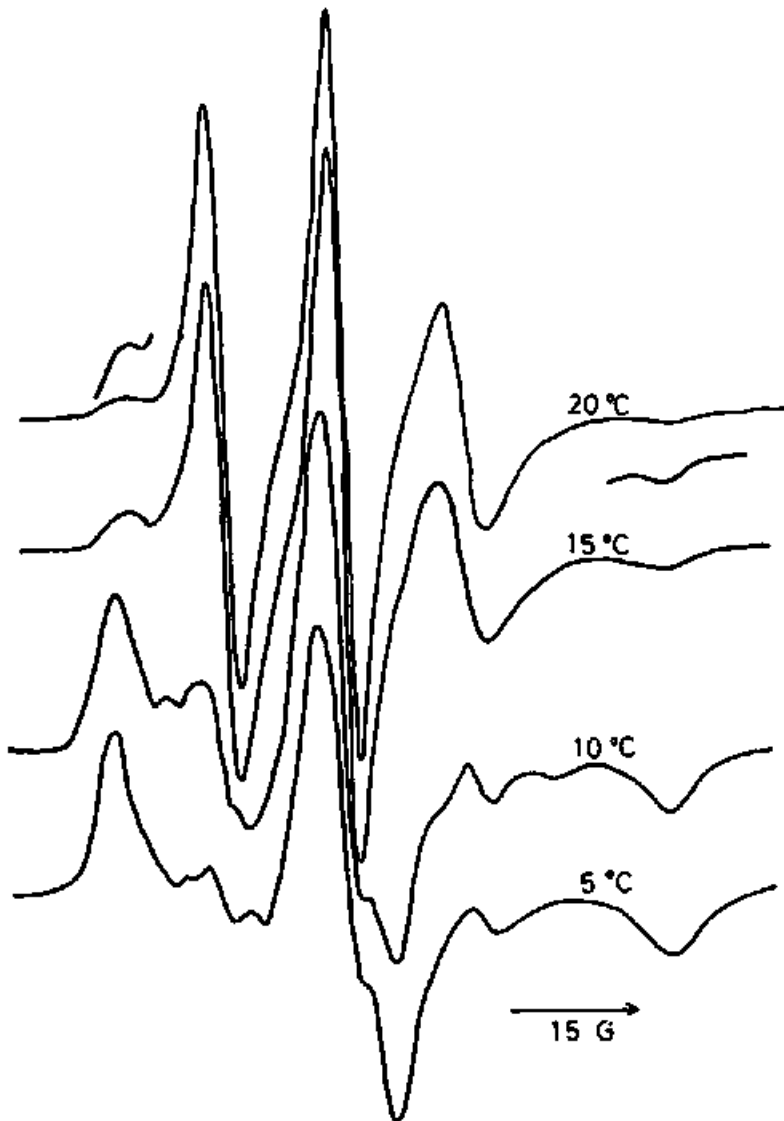
12.5 $\mu$ M の  
 ホリ工ニ  
 系抗生物  
 質の緩衝  
 液 (150mM  
 NaCl, 50mM  
 Tris-HCl,  
 pH7.5) 溶  
 液 (実線)  
 とこの4  
 ml に 10mM  
 のコレス  
 テロール  
 のエタノ  
 ール溶液  
 10ml を加

え (破線), それぞれ吸収スペクトルを測定  
 した。

EFFECT OF STEROL OR STEROID SPIN PROBE ON OPTICAL  
ABSORPTION SPECTRUM OF POLYENE ANTIBIOTIC

	Ratio of optical density at peak 3 to peak 1	
	Filipin	Amphotericin B
None	0.837	1.16
Cholesterol	1.019	1.48
Ergosterol	0.993	1.29
Epiandrosterone	0.923	1.23
Epiandrosterone spin probe	0.919	1.32

表3. ポリエン系抗生物質は  $12.5\mu\text{M}$  の緩衝液 ( $150\text{mM NaCl}$ ,  $50\text{mM Tris-HCl}$ ,  $\text{pH}7.5$ ) 溶液にして、ユニオン技研製 RA112 高感度分光光度計で、 $22$  度で測定した。ステロールまたはスピノプローブは  $10\text{mM}$  のエタノール溶液から  $10\mu\text{l}$  を取り、上の  $4\text{ml}$  の溶液に加えて相互作用を調べた。スピノプローブの吸収を補正するためには、等量のスピンプローブを対照にも加えて測定した。ピーク 3 とピーク 1 の比は、フィリピンでは  $\frac{OD_{320}}{OD_{356}}$ 、アンフォテリシン B では  $\frac{OD_{359}}{OD_{411}}$  である。

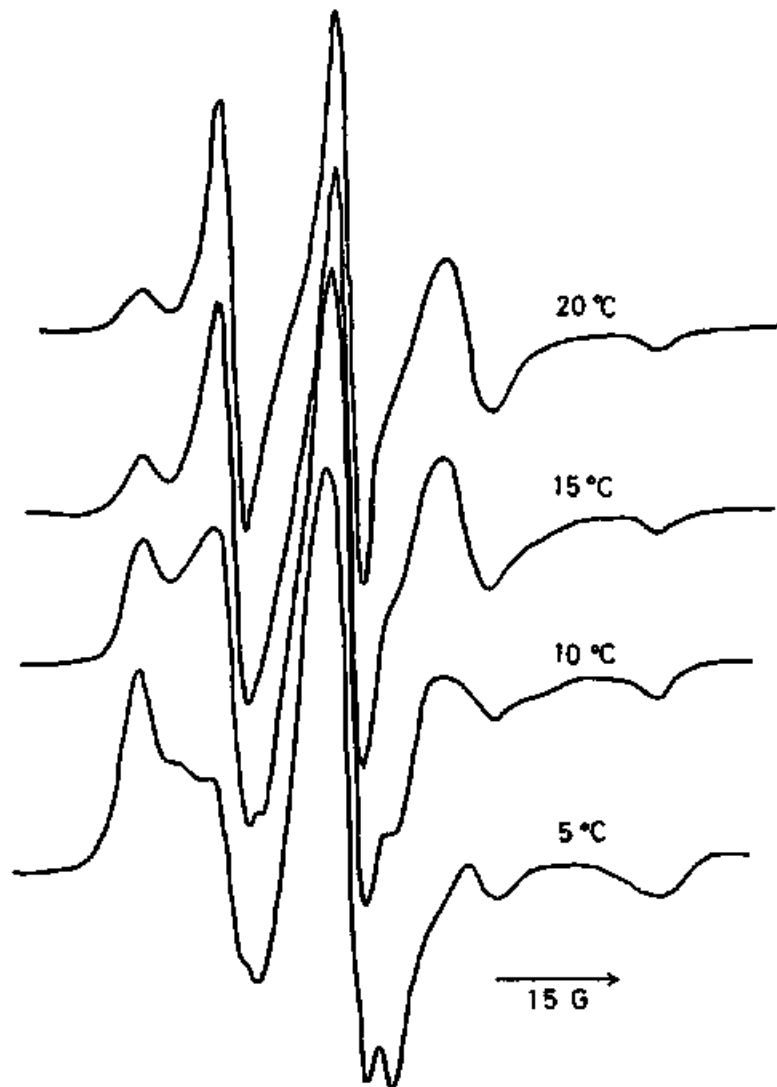


ESR SPECTRA OF EPIANDROSTERONE SPIN PROBE  
IN DEPC VESICLES TREATED WITH FILIPIN

図 21

材料と方法に述べたように、フィリピンで処理したかエツワルを20度で遠心し、この上澄を試料とする。試料中の DEPC は 1.1 モルパーセントの EASP と 12 モルパーセントのフィ

リピンを含む。 ESR 測定は、1 分間に 0.5 度の割合で温度を変え、各温度で行った。



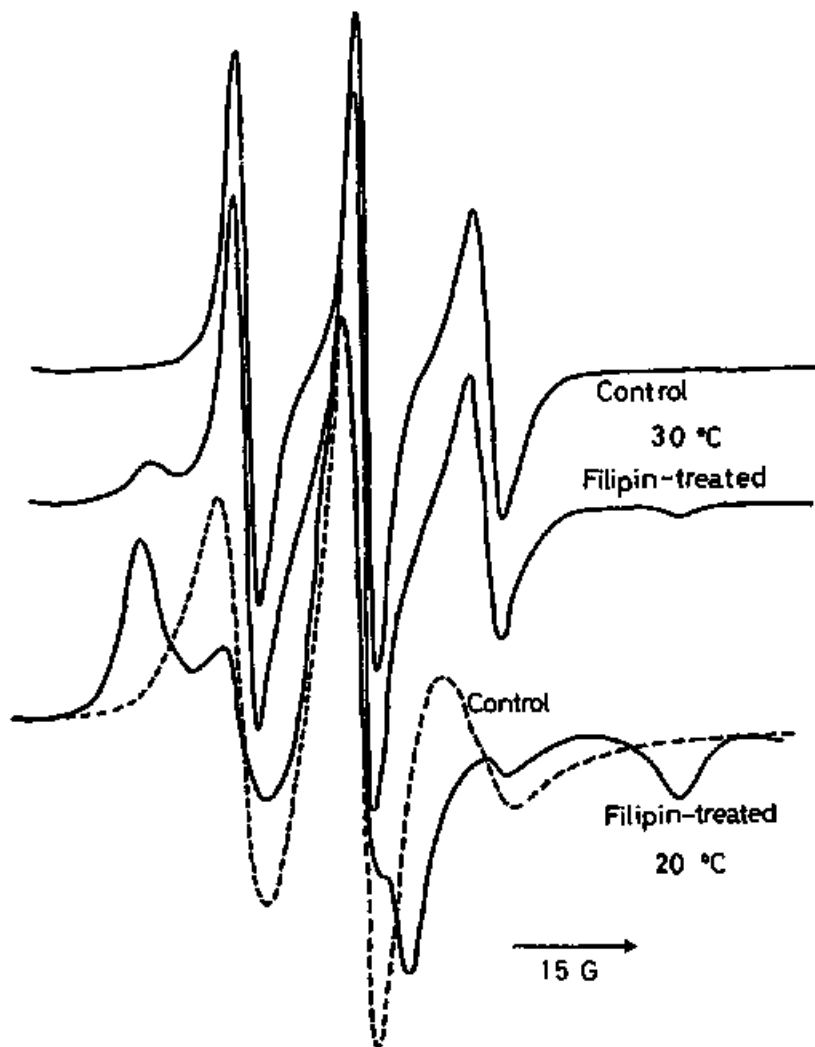
ESR SPECTRA OF EPIANDROSTERONE SPIN PROBE  
IN DEPC VESICLES TREATED WITH AMPHOTERICIN B

図 22

材料と方法に述べたように、アンフォテリツン B で処理したガエツワルを 20 度で遠心し、この上澄を試料とする。試料中の DEPC は 1.1 モルパーセントの EASP と 9.0 モルパーセント

トのアンフォテリツン B を含む。ESR 測定は、1 分間に 0.5 度の割合で温度を変え、各温度で行った。



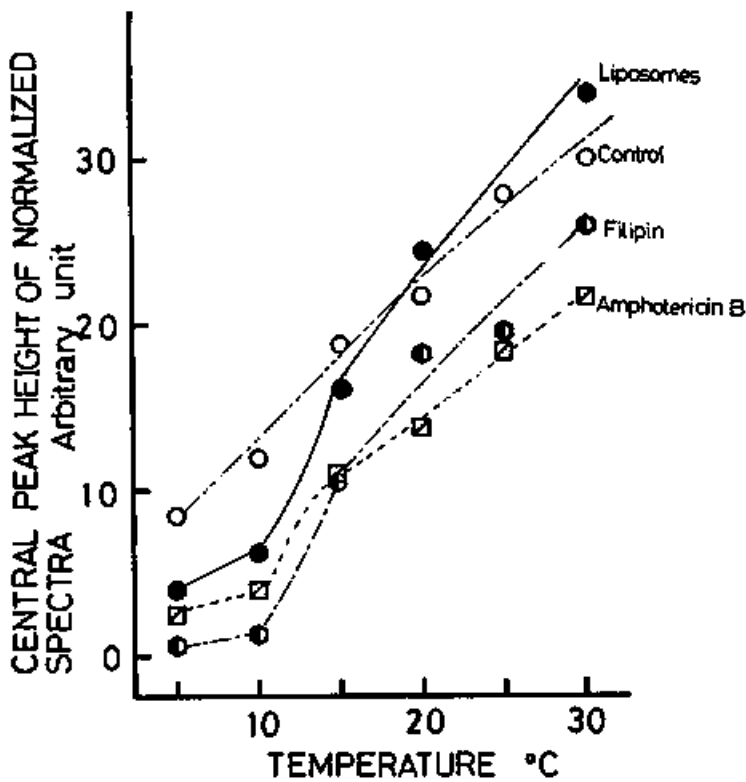


ESR SPECTRA OF EPIANDROSTERONE SPIN PROBE  
IN FILIPIN-TREATED LIPOSOMES OF DMPC

図 23

5mg の DMPC  
 × 25  $\mu$ g の EASP  
 を 0.5mg の緩  
 衝液 (150mM NaCl,  
 50mM Tris-HCl,  
 pH7.5) 中でリ  
 ホソマー A に調  
 製する。こ  
 の試料を対照  
 とし、一方、  
 フィリピン処  
 理は、この 0.2  
 ml に 20  $\mu$ l の 50

mM フィリピンを加えて、ESR で各温度のスペ  
 クトルを測定した。



CHANGE OF SPECTRA IN P. ANTIBIOTICS-TREATED & NON-TREATED VESICLES OF DEPC

図 24

対称とフィリピン処理の試料は図 21 に述べたのと同様に調製して測定を行った。アンフォテリシン B 処理の試料は図 22 に述べたのと同様に調製して測定を行った。比較のため

めは示したりホゾームは、図 21 でりホゾームまで調製した試料を用いて、ESR 測定をした。ESR スペクトルはコンピュータで積分し、一定の吸収強度に規格化したスペクトルの中央ピークの高さを求めた。

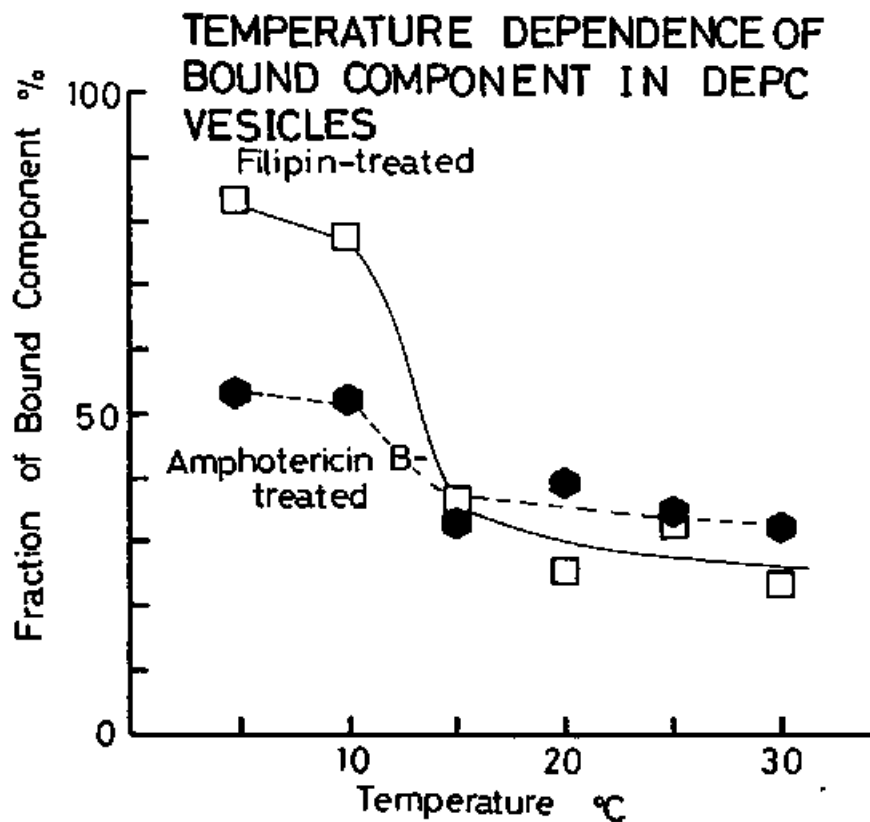


図25. フィリピン処理の試料は図21と同様に、アンフォテリツンB処理の試料は図22と同様に調製と測定を行った。積分して、一定の吸収強度に規格化されたESRスペクトルで、ポリエー系抗生物質と相互作用しての成分が対照のスペクトルに対して減少している割合から、結合しているEASPの割合を求めた。

TEMPERATURE DEPENDENCE OF OVER-ALL SPLITTING IN DEPC VESICLES

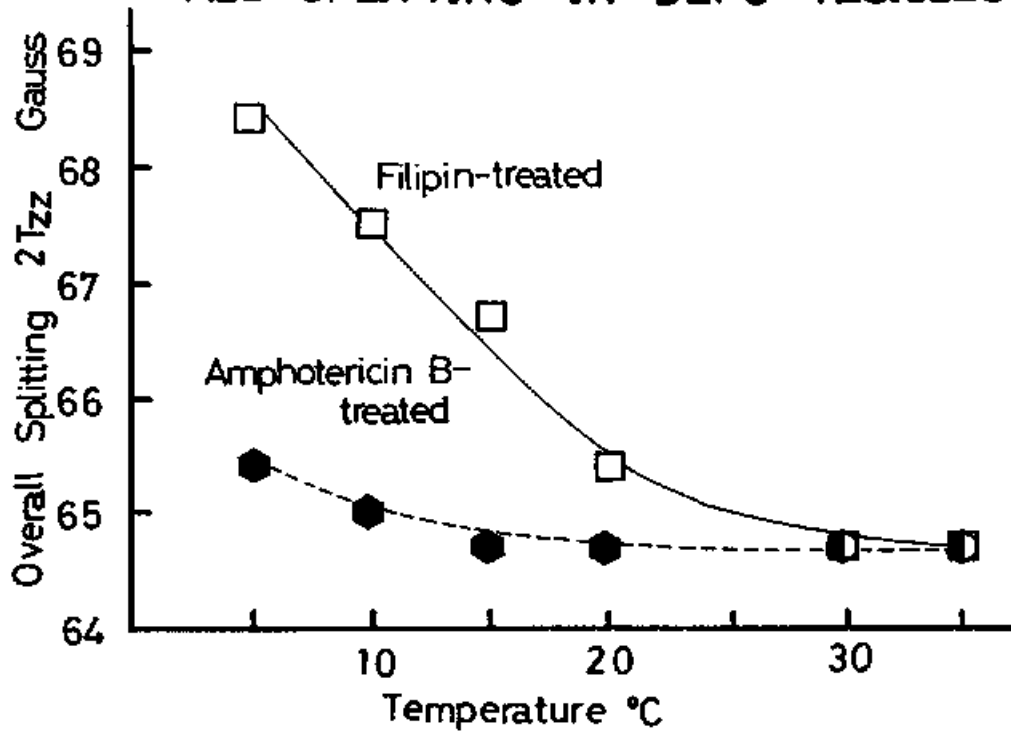


図 26. フィリピン処理の試料は図 21 と同様に、アンフォテリツン B 処理の試料は図 22 と同様に調製と測定を行った。ESR スペクトルのポリエンス系抗生物質と相互作用している成分の低磁場ピークと高磁場トランプの間の最大分離幅を求めた。図 17 の ↓ 印を参照。