



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生体膜への脂溶性イオンの吸着現象の解析：膜電位測定法の確立
Author(s)	出村， 誠
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	甲第2215号
Issue Date	1986-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32597
Type	doctoral thesis
File Information	2215.pdf



生体膜への脂溶性イオンの吸着現象の解析：

膜電位測定法の確立

北海道大学 薬学部

出村 誠

目 次

略語表	IV
第1章 序論	1
引用文献	7
第2章 リポソームへの脂溶性イオンの吸着現象	9
2-1 緒言	9
2-2 実験材料	11
2-2-1 リポソームの調製	11
2-2-2 脂溶性イオンおよびスピンプローブの合成	11
2-3 脂溶性イオン吸着の測定法	16
2-3-1 脂溶性イオン選択性電極による方法	16
2-3-2 電子スピン共鳴による方法	18
2-4 結果と考察	21
2-4-1 リポソームへの脂溶性イオンの吸着	21
2-4-2 脂溶性イオンの吸着サイト	38
2-4-3 脂溶性イオンの吸着と脂質の相転移	42
2-5 まとめ	53
引用文献	54
第3章 高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオンの吸着および 膜電位推定値の比較	56
3-1 緒言	56

3-2 実験材料および方法	58
3-2-1 実験材料	58
3-2-2 測定方法	58
3-3 結果と考察	62
3-3-1 高度好塩菌膜ベシクルへのプローブの吸着	62
3-3-2 膜電位推定とプローブ吸着モデルの比較	68
3-3-3 プローブ吸着およびとりこみへのTPB ⁻ の効果	75
3-3-4 とりこみ速度定数へのTPB ⁻ の効果	78
3-4 まとめ	81
引用文献	82

第4章 高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着を補正した 膜電位測定	85
4-1 緒言	85
4-2 実験材料および方法	86
4-2-1 実験材料	86
4-2-2 測定方法	86
4-2-3 脂溶性イオン吸着モデル	86
4-3 結果と考察	90
4-3-1 プローブ吸着およびみかけの膜電位	90
4-3-2 プローブ吸着しない状態への外挿法	93
4-3-3 プローブ吸着を補正した膜電位計算式	106
4-4 まとめ	116
引用文献	117

第5章	ミトコンドリアへの脂溶性イオン吸着を補正した	
	膜電位測定	119
5-1	緒言	119
5-2	実験材料および方法	121
5-2-1	実験材料	121
5-2-2	測定方法	121
5-3	結果と考察	123
5-3-1	脱エネルギー状態のミトコンドリアへの プローブ吸着	123
5-3-2	高エネルギー状態のミトコンドリアの膜電位	127
5-4	まとめ	138
	引用文献	139
第6章	高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン	
	とりこみの速度論	141
6-1	緒言	141
6-2	実験材料および方法	143
6-2-1	実験材料	143
6-2-2	測定方法	143
6-3	結果と考察	145
6-4	まとめ	159
	引用文献	160
第7章	総括	162
	付録	165

略語表

A	最大吸着量
B	ESRから測定した吸着量
C_r	r領域のプロープ濃度($r = o, m_o, m_i, i$)
C_i^{app}	みかけの小胞内プロープ濃度
C_m	小胞内外のプロープ濃度 C_i, C_o の平均濃度
C_t	吸着量の濃度変化をDixon plotしたときの勾配の変化する濃度
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
nDSA	n-doxylstearic acid($n = 3, 5, 7, 12$)
f	$K_{m_o} V_{m_o} / K_b$
FCCP	carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenyl hydrazone
ΔG	吸着に伴う自由エネルギー変化
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperadineethanesulfonic acid
H	ESRスペクトルの高磁場側のシグナル高さ
H_b	吸着プロープのESRスペクトルの高磁場側のシグナル高さ
H_f	水相にfreeに存在するプロープのESRスペクトルの高磁場側のシグナル高さ
H_f°	全プロープが水相にfreeに存在する場合のESRスペクトルの高磁場側のシグナル高さ
H_1	スピンスピン交換相互作用のないときのESRスペクトルの中央シグナル高さ
H_2	スピンスピン交換相互作用があるときのESRスペクトルの中央シグナル高さ

ΔH	吸着に伴うエンタルピー変化
i	小胞内領域
J_{on}	膜電位によるプローブとりこみの流束
K	解離定数
K_b	吸着係数 ($= K_{eo}V_{eo} + K_{ei}V_{ei}$)
K_{ei}	膜電位ゼロの場合の k_6/k_5
K_{eo}	膜電位ゼロの場合の k_1/k_2
k_r	速度定数 (図4-1参照)
k_{on}	光照射時の速度定数
k_{off}	光消去時の速度定数
MES	4-morpholineethanesulfonic acid
mi	膜内部表面領域
mo	膜外部表面領域
n	mo 領域で作用する膜電位のフラクシヨン
o	外液領域
probe n	スピンプローブ ($n = I, II, III$)
P_{on}	光照射時のプローブ透過係数
P_{off}	光消去時のプローブ透過係数
R.C.R.	呼吸調節率
S.D.	標準偏差
SDS	sodium dodecyl sulfate
ΔS	吸着に伴うエントロピー変化
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl
TPMP ⁺	triphenylmethyl phosphonium
TPEP ⁺	triphenylethyl phosphonium

TPPP ⁺	triphenylpropyl phosphonium
TPBP ⁺	triphenylbutyl phosphonium
TPAP ⁺	triphenylamyl phosphonium
TPHP ⁺	triphenylhexyl phosphonium
TPP ⁺	tetraphenyl phosphonium
TPB ⁻	tetraphenyl boron
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
T _c	相転移温度
U	小胞へのプローブとりこみ量
U _b	膜電位ゼロの場合での吸着量
U _b (0)	膜電位ゼロの場合での吸着量(=U _b)
U _b (Δψ)	膜電位存在下での吸着量
V _r	r領域の体積(r = o, mo, mi, i)
X _r	r領域に存在するプローブ量(r = o, mo, mi, i)
Δψ	外液側を基準とした膜電位
Δψ ^{app}	プローブ吸着を無視したみかけの膜電位
ΔμH ⁺	プロトンの電気化学ポテンシャル差
μ ^o	水相のプローブの標準電気化学ポテンシャル
μ _r	r領域のプローブの標準電気化学ポテンシャル(r = mo, mi)

第1章 序論

生体膜は流動モザイクモデル[1]に代表されるように、脂質二分子膜にタンパク質が組み込まれた構造が基本である。細胞はこのような膜で区切ることにより、外界とは異なるシステムを構成している。生体膜の特徴は、単なる隔壁としての役割だけではない。重要なことは、膜を介して細胞の外部と内部が、特異的な連結をしていることである。つまり、生体膜上で物質の輸送、エネルギーの変換、情報の受容、変換などが行われることにより、細胞は一個体として '生きた状態' が維持できるのである。これらの機能は生体膜に組み込まれたタンパク質を介して発現される。たとえば膜輸送では、膜を貫いて輸送をつかさどるタンパク質が存在すると考えられている。このタンパク質を介してイオンが細胞内外を移動すれば、膜電位（膜で隔てられた二水相間の電位差）が発生する。また情報の受容に伴って、膜電位変化が起こることが報告されている。このように多くの細胞活動において、膜機能の発現は膜電位変化を伴うことが示されている。なかでも次に述べる化学浸透圧説は、生体機能における膜電位の重要性を確立したものである。酸化的リン酸化は有機化合物の酸化によってATPが合成されることであり、研究の初期には細胞内可溶性酵素によると考えられた。しかし現在では、膜上に配列された種々の酵素によって有機化合物が酸化され、同時に起こる H^+ 輸送によって、ATP合成の駆動力が生じることが明らかにされている。代謝反応と輸送がcoupleしているので、ベクトルの代謝

とも呼ばれている。このようにして H^+ が輸送されると、膜電位が生じる。同様に能動輸送やペン毛の運動でも膜電位が重要であることがわかっている。

Mitchell[2,3]の化学浸透圧説によれば、酸化的リン酸化、光リン酸化において、電子伝達系で生じたエネルギーは、膜を隔てたプロトンの電気化学ポテンシャル差 $\Delta \mu H^+$ に変換される。 $\Delta \mu H^+$ は膜電位($\Delta \psi$)とpH差(ΔpH)の項からなる。 $\Delta \mu H^+$ は膜内の H^+ -ATPaseのプロトンポンプによってATP合成に使用される。 $\Delta \mu H^+$ とATP合成の共役機構は次の4つの仮定からなる。(1) $\Delta \mu H^+$ を保持できる膜構造である、(2)電子伝達系は膜内で異方的に配列している、(3) $\Delta \mu H^+$ で駆動される H^+ 輸送性のATPaseが膜に存在する、(4) $\Delta \mu H^+$ を利用したイオンなどの輸送担体が膜に存在する。この仮説はミトコンドリアやチラコイド膜などで確かめられている。但しATP合成モル数と移動した H^+ のモル数との化学量論的解析に関しては、さかんに議論されている[3-7]。

能動輸送は、物質が膜内外の電気化学ポテンシャル勾配に逆らって輸送される現象である。能動輸送は大別して第一次能動輸送と第二次能動輸送に分けられる。前者は H^+ -ATPase、 Na^+ 、 K^+ -ATPaseなどの膜内ATPaseにみられる現象で、ATP加水分解のスカラー的エネルギー変化を、物質輸送のベクトルのエネルギーに変換する輸送機構である。また光エネルギーをイオン輸送の駆動力に変換する担体、たとえば高度好塩菌のバクテリオロドプシンは光駆動性の H^+ ポンプであり、前者に分類される。後者は第一物質の電気化学ポテンシャル勾配に従った受動輸送に共役して、同時に存在する第二物質が輸送される機構である。また第二物質の輸送方向によって、共輸送と

対向輸送に分けられる。

細胞の膜電位を直接測定するには微小電極を刺入する方法がある。この方法は薬物処理によって巨大化した*Escherichia coli*に対して用いられた報告[8]がある。しかし一般にバクテリアやオルガネラレベルの小胞は微小電極を適用するには小さすぎるため、この方法は使用できない。

これまでの微小細胞ないしは小胞の膜電位測定法は、次の 3つの方法に分類できる。

- (1) 微小電極を刺入して膜電位を直接測定する
- (2) 膜電位指示薬（プローブ）を導入する
- (3) 細胞膜に内在している膜電位応答性色素を利用する。

ここで (3) は特定のバクテリア、たとえば光合成細菌[10, 11]などに対して用いられる。この膜にはカロチノイドが含まれている。カロチノイドの吸収スペクトルは電場によってスペクトルシフトをおこすので、これを利用して膜内電場変化を知ることができる。(2)の方法は、(1)の微小電極が使えない小胞に対して、間接的に推定する方法として有効である。(2)の中に蛍光プローブを用いる方法と脂溶性イオンの小胞内外の分配を用いる方法があり、測定原理はそれぞれ異なる。蛍光プローブは膜電位による蛍光強度変化を測定し、市販の蛍光分光光度計で容易に実験が行えるので、よく使われるようになってきた。しかし蛍光強度変化に与える因子が膜電位だけでないため、膜電位絶対値を求めるには原理的に不明な点が多い。それに対して、脂溶性イオンを用いる方法は測定原理が明確である。これまで用いられてきた脂溶性カチオンは, valinomycin + $K^+(Rb^+)$, dibenzyltrimethylammonium(DDA^+), Triphenylmethylphosphonium

(TPMP⁺), Tetraphenylphosphonium(TPP⁺)などがある。これらの脂溶性イオンは生体膜を自由に透過できる[12-16]。最初これらのプローブがミトコンドリアやバクテリアに適用され、呼吸の活性化により内部へのとりこみが観測された[12,13]。小胞内外のプローブの分布から、膜電位が推定できる。

outer	membrane	inner
C_o		C_i
ψ_o		ψ_i

小胞内外の電位を ψ_i 、 ψ_o とする。膜電位 $\Delta\psi$ は外液を基準として $\psi_i - \psi_o$ で定義する。内部負の膜電位が発生しているとき、脂溶性のカチオンは膜電位勾配に従って電気泳動的に内部にとりこまれる。平衡状態において、小胞内外のプローブの電気化学ポテンシャルは等しくなるので次式が成立する。

$$RT \ln C_o + z F \psi_o = RT \ln C_i + z F \psi_i$$

ここで C_i, C_o は小胞内外のプローブ濃度、 R, T, F は気体定数、絶対温度、ファラデー定数、 z はプローブの電荷数（符号を含む）である。この式を変形すると

$$\Delta\psi = \psi_i - \psi_o = (RT/zF) \ln(C_o/C_i) \quad (1-1)$$

が得られる。従って小胞内外のプローブ濃度 C_i, C_o がわかれば、外

液を基準とした膜電位 $\Delta\psi$ を知ることができる。プローブ濃度の測定法には、(1)吸光法[13]、(2)アイソトープラベルしたプローブを用いる方法[14]、(3)脂溶性イオン選択性電極による方法[6, 28]等がある。

脂溶性イオンで得られた膜電位と微小電極で直接測定した値の比較が行なわれている。これらの膜電位はよく一致するという報告[1]があるが、他の報告[17]では一致しなかった。この理由は1-1 式が適用できないのではなく、むしろ本論文で問題にするように、 C_i の推定に誤差があること、及び小胞に微小電極を刺入して測定された値が不正確であるためであると考えられている。また蛍光プローブと脂溶性イオン(valinomycin + K^+ (Rb^+), TPMP $^+$, TPP $^+$)を用いて推定したそれぞれの膜電位の比較が報告されている[18-25]。定性的には同様な結果であるが、異なる方法で得られた膜電位は、一致しないと報告されている[13, 19, 20, 22, 23, 25, 26]。また脂溶性イオンの種類が異なると、同一条件で測定しても一致しないことが明らかになった[28]。このように脂溶性イオンを用いる方法の測定原理は明確であるが、用いたプローブによって膜電位が異なるという問題点がある。この原因として考えられることは、プローブの吸着である。これまでの測定法は膜あるいは細胞内器官への吸着量を見逃し、 C_i は内部へのとりこみ量(mole)すべてを内部体積(1)で割って計算するか、または吸着補正しても膜電位に対して不変であると仮定する場合が多かった。しかしながら正確な膜電位を測定するには、脂溶性イオンの吸着の問題を明らかにすることが必要であると考えられる。

本研究は脂溶性イオンを用いたバクテリアやオルガネラなどの小胞の膜電位測定法の確立を目的として、生体膜への脂溶性イオンの吸着現象の解析をまとめたものである。本論文は、7章から構成されている。

第1章：序論。

第2章：リポソームへの脂溶性イオンの吸着現象を解析する。リポソームは脂質二分子膜からなる小胞で生体膜モデルとしてしばしば用いられる。そこでこのモデル膜を用いて脂溶性イオン吸着機構に関して明らかにした基本的事項について述べる。

第3章：高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着を測定し、膜電位推定のための各種吸着モデルの比較を行なう。

第4章：高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着の補正法について考察する。さらに「吸着のない状態」への外挿法を理論的に明らかにし、吸着補正した膜電位計算式を提出する。

第5章：ミトコンドリア膜への脂溶性イオン吸着を測定し、第4章で提出した膜電位計算式の適用性について論ずる。

第6章：高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオンとりこみの速度論について議論する。

第7章：本研究の総括。

引用文献

- 1 Singer, S.J. and Nicolson, G.I. (1972) *Science* 175, 720-731
- 2 Mitchell, P. (1961) *Nature* 191, 144-148
- 3 Mitchell, P. and Moyle, J. (1967) *Biochem. J.* 105, 1147-1162
- 4 Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H., Okamoto, H. and Kagawa, Y.
(1976) *J. Membrane Biol.* 30, 121-134
- 5 Thayer, W. and Hinkel, P.C. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5395-5402
- 6 Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y. (1979)
J. Membrane Biol. 49, 105-121
- 7 Shen, C., Boens, C.C. and Ogawa, S. (1980) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 93, 243-249
- 8 Felle, H., Porter, J.S., Slayman, C.L. and Kaback, H.R. (1980)
Biochem. 19, 3585-3590
- 9 Mitchell, P. (1979) *Eur. J. Biochem.* 95, 1-20
- 10 Symons, M., Botte, P. and Sybesma, C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 806, 161-167
- 11 Jackson, J.B. and Crofts, A.R. (1969) *FEBS Lett.* 4, 185-189
- 12 Grinius, L.L., Jasaitis, A.A., Kadziauskas, Yu.P., Liberman, E.A., Skulachev, V.P., Topali, V.P., Tsofina, L.M. and Vlasimirova, M.A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 1-12
- 13 Halord, F.M. and Papineau, D. (1972) *J. Membrane Biol.* 8, 27-44
- 14 Ramos, S., Schuldiner, S. and Kaback, H.R. (1979) *Methods Enzymol.* 55, 680-688

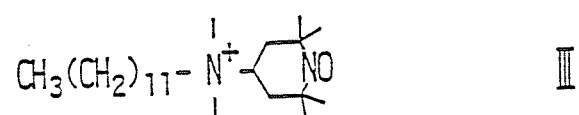
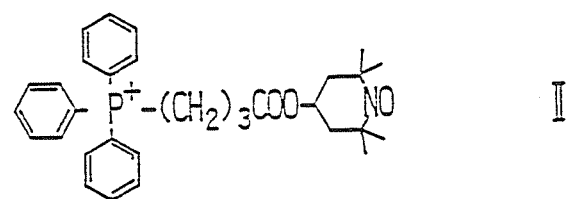
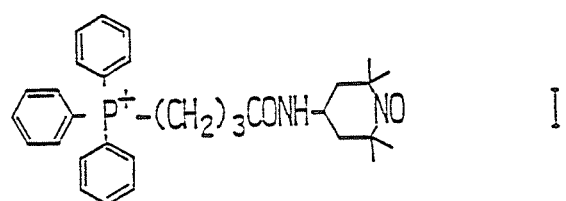
- 15 Heinz, E., Geck, P. and Pietrzyk, C. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 264, 428-441
- 16 Rottenberg, H. (1979) *Methods Enzymol.* 55, 547-569
- 17 Vacada, V., Kotyk, A. and Singer, K. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 643, 265-268
- 18 Zaritsky, A., Kihara, M. and Macnab, R.M. (1981) *J. Membrane Biol.* 63, 215-231
- 19 Casadio, R., Venturoli, G. and Melandri, B.A. (1981) *Photobiochem. Photobiophys.* 2, 245-253
- 20 Bakker, E.P. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 681, 474-483
- 21 Kuroki, M., Kamo, N., Kobatake, Y., Okimasu, E. and Utsumi, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 693, 326-334
- 22 Guffanti, A.A., Blumenfeld, H. and Krulwich, T.A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8416-8421
- 23 Bakker, E.P. and Halord, F.M. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 433-440
- 24 Ghazi, A., Schechter, E., Letellier, L. and Labedan, B. (1981) *FEBS Lett.* 125, 197-200
- 25 Ahmed, S. and Booth, I.R. (1981) *Biochem. J.* 200, 573-581
- 26 Eraso, P., Mazon, M.J. and Gancedo, J.M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 778, 516-520
- 27 Hofer, M. and Kunemund, A. (1984) *Biochem. J.* 225, 815-819
- 28 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812, 377-386
- 29 Mitchell, P. and Moyle, J. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 471-483

第2章 リポソームへの脂溶性イオンの吸着現象

2-1 緒言

脂溶性イオンは、バクテリアやオルガネラなどの小胞に発生する膜電位を推定するためのプローブとして、広く使用されている。この測定原理は、第1章で述べたように、プローブが膜を自由に透過でき、小胞内外に分布することを利用する。しかしながら、脂溶性イオンをプローブとする膜電位推定法には、膜へのプローブ吸着のために、膜電位の測定誤差が生じるという問題がある。正確な膜電位を求めるための吸着の補正法を明らかにするには、脂溶性イオンの生体膜への吸着機構を明らかにすることが、まず必要である。そこで本章では、生体膜モデルとしてリポソームを用い、各種脂溶性イオンの吸着現象について解析する。実際の生体膜の主な構成要素は、脂質とタンパク質であるが、本章では脂質のみから成るリポソームで、吸着の基本的事項を明らかにする。膜電位のプローブとしてしばしば用いられるTPP⁺、TPMP⁺およびその同族体 (Phe)₃-P⁺-(CH₂)_n-CH₃ (n=0-5) を使用して、脂溶性イオン選択性電極でリポソームへの吸着量を求める。またスピンラベルした脂溶性イオンを合成し、電子スピン共鳴(E S R)から、吸着量を調べる。これらの測定から、脂溶性イオン吸着にともなう熱力学量を示す。またスピンプローブの吸着サイトを、E S R測定から明らかにする。使用した

スピンプローブを以下に示す。



スピンプローブ

2-2 実験材料

2-2-1 リボソームの調製

リボソームには2種類の脂質、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC , SIGMA Chemical Co.)、egg lecithin(egg phosphatidylcholine, Aldrich Chemical Co.)を使用した。egg lecithinは精製して使用した。精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて行った(展開溶媒; クロロホルム: メタノール = 10:1)。純度はシリカゲル薄層クロマトグラフィー(溶媒、クロロホルム: メタノール: 28% アンモニア: 水 = 120:80:10:5)で検定した。

リボソーム作製はつぎの方法で行なった。100 mM NaCl, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperadineethanesulfonic acid(HEPES)/OH (pH 7.0)の溶液に脂質を分散させ、超音波処理(20 kHz, 120 W, 15 min)後、遠心(100000 x g, 60 min)で上清をとり、単一膜リボソームを得た。

2-2-2 脂溶性イオンおよびスピンプローブの合成

脂溶性イオンはつぎのものを使用した。

triphenylmethylphosphonium (TPMP⁺)

triphenylethylphosphonium (TPEP⁺)

triphenylprorylphosphonium (TPPP⁺)

triphenylbutylphosphonium (TPEP⁺)

triphenylamylphosphonium (TPAP⁺)

triphenylhexylphosphonium (TPHP⁺)

tetraphenylphosphonium (TPP⁺)

TPP⁺は同仁化学、その他は東京化成より購入した。

スピンプローブの合成[1,2]

(a) probe I

triphenylphosphine (60 m mol)と γ -chlorobutylic acid (60 m mol) を140°C, 20 時間加熱し、白色固体を得た。生成物をエーテルで洗浄し、エタノール：エーテル=3:2 から再結晶した（収率39%）。再結晶物(20 m mol) をアセトニトリル 40 mlに加え、-10°C に氷冷、攪拌しながら thionylchloride 10 ml(140 m mol)を滴下した後、室温で30分間反応させた。溶媒留去後、アセトニトリル10 mlを加えた。これを、4-amino-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine (60 m mol)、アセトニトリル30 ml溶液中に滴下（氷冷、攪拌）した後、室温で15時間反応させた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（0-30%メタノール／クロロホルム）で生成物を分離した（収率35%）。シリカゲルTLCで純度を検定し、IR, NMRで同定した。図2-1と図2-2にIR, NMRのチャートを示す。

生成物(0.96 m mol), EDTA 86 mg, 10 N NaOH 0.12 ml, Na₂WO₄ 0.1 g, 30% H₂O₂ 1.26 ml, 水 5 mlを混合し、室温で1日反応させた。1 N NaOH でpHを10に調整し、30% H₂O₂ 1.26 mlを加えてさらに2日反応させた。スターラで激しく攪拌した後、溶媒留去、エタノール、ベンゼンで共沸した。口過、溶媒留去後、水を1 ml 加えた。

陽イオン交換樹脂カラム(SP-Sephadex C-25)を1 M ammonium hydrogen carbonateでNH₄⁺型にした後、サンプルを吸着させ、カラム体積の2倍量の水で2回洗浄後、0.5 M ammonium hydrogen

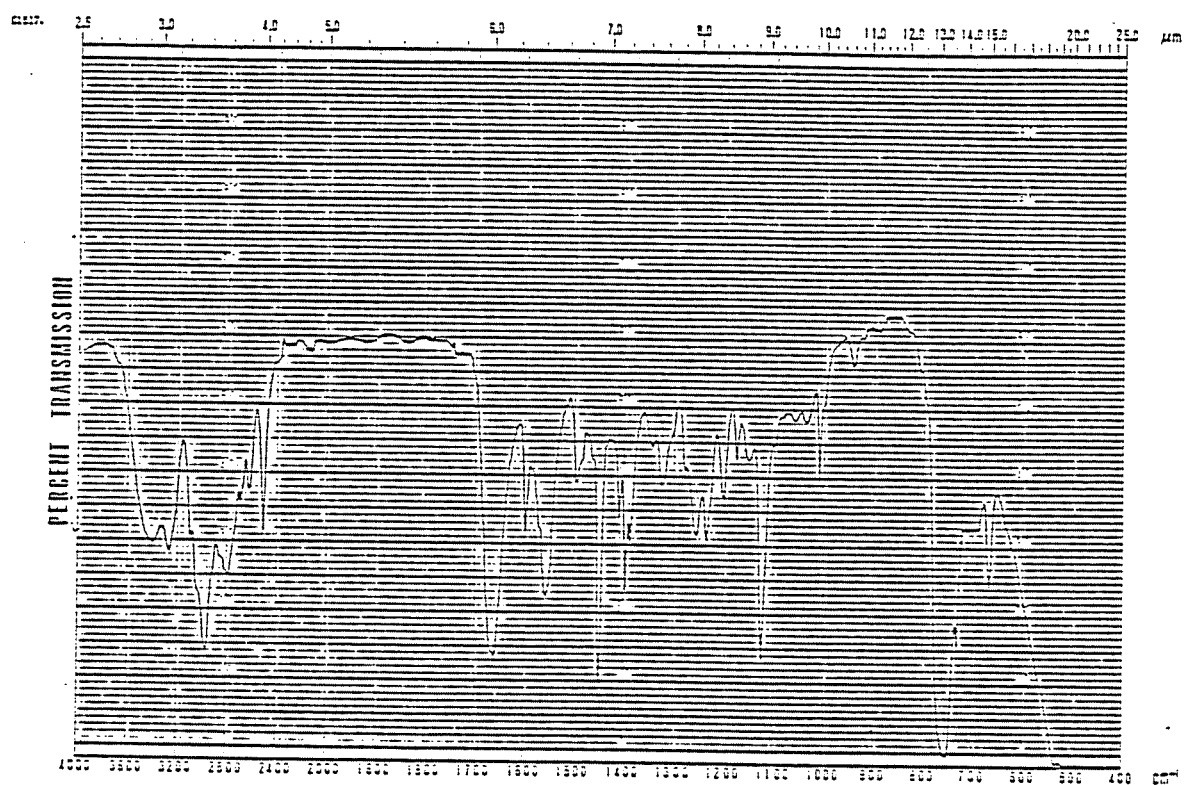


図2-1 probe I (non-radical)の赤外吸収スペクトル

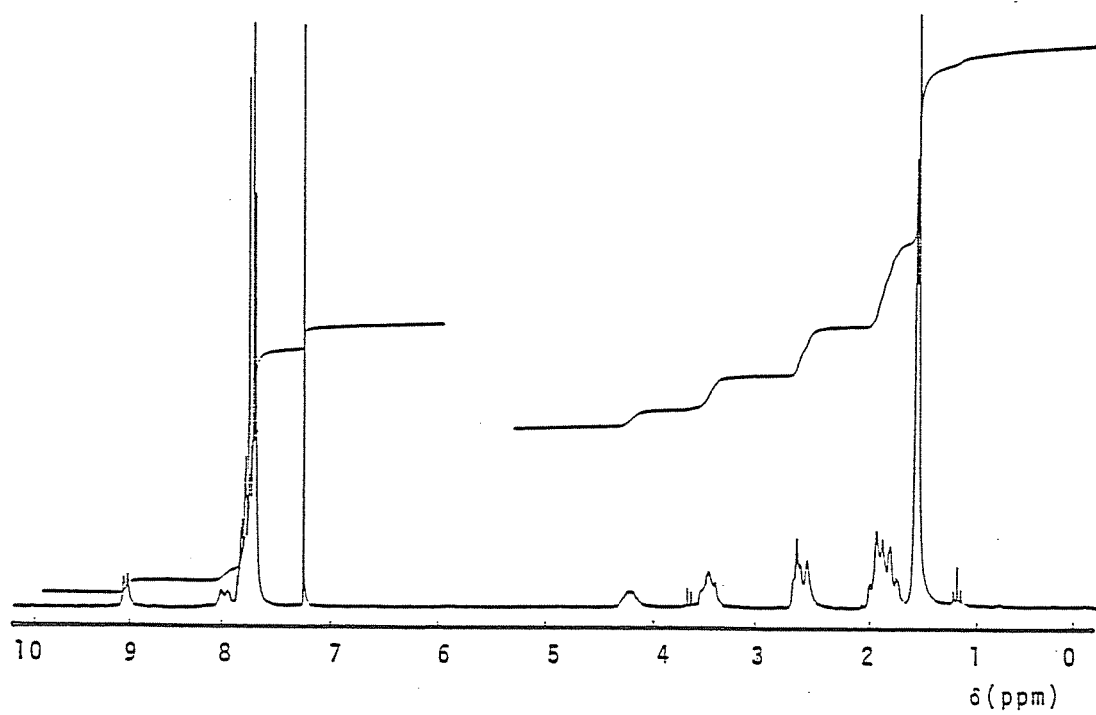


図2-2 probe I (non-radical)のプロトン核磁気共鳴

carbonateで黄色バンドを溶出させた。溶媒留去後、エタノールを加え、析出した塩を口過した。水を加え、1 N HClでpH 3 に調整し、激しく攪拌後、水を留去した。エタノール添加、留去を 2 回行ない、減圧乾燥して、生成物を得た。ESRよりNOラジカルを同定した。シリカゲルTLC(クロロホルム：メタノール= 3:1)で、単スポットであることを確認した。元素分析値(計算値 $C_{31}H_{39}N_2O$: C,69.20; H,7.31; N,5.21. 実測値 C,66.20; H,7.56; N,4.39)。

(b) probe II

Molecular Probes Co.により合成されたものを使用した。

(c) probe III

既に報告されている方法[2]で、田辺により合成されたものを使用した。

2-3 脂溶性イオン吸着の測定法

2-3-1 脂溶性イオン選択性電極による方法 [3]

リポソームへの脂溶性イオンの吸着量は、脂溶性イオン選択性電極を用いて測定した。2-2-2 に示した脂溶性イオンに、それぞれ選択的な電極を作製した。作製法はTPP⁺選択性電極 [4,5] の場合と同様である。図2-3 に測定装置の略図を示す。この電極は小型化されているため、測定液は 1 ml で十分である。また電気ノイズを低下させるため、ステンレスチューブ (5 mm) でシールドしてある。電極は使用前に 10 mM のそれぞれの脂溶性イオン溶液に浸せきし、感応膜のイオン交換を行なった。参照電極は Ag | AgCl 電極を使用し、測定液と塩橋で連結した。塩橋は 2 % 寒天を含む 3 M KCl で作製した。選択性電極と参照電極間に発生する電極電位は、脂溶性イオン濃度が 5×10^{-7} M から 0.1 M の間で Nernst の式に従った。測定に際して、そのつど脂溶性イオン濃度既知の測定液で電極電位のチェックを行なった。測定液は二重キュベット内に入れ、恒温水で温度を一定に保って測定した。電極電位は electrometer (Takeda Riken TR 8651) で測定し、シグナルは A/D converter (A&D Electric Co. Tokyo) からコンピュータ (NEC PC-9801) に取り込んだ。吸着量はコンピュータで real time に計算した (付録-A にプログラムを示す)。

吸着量の計算は次の方法で行なった。V₁ ml のストックリポソームサスペンション (P mg lipid/ml) をプローブ濃度 C₀ の測定液 V₀ ml (=1 ml) に加えると電極電位差 ΔE が観測できる。ΔE はつぎのふたつの原因による。(1) ストックリポソームサスペンションを加えたことによるプローブ濃度の希釈, (2) リポソームへのプローブの吸

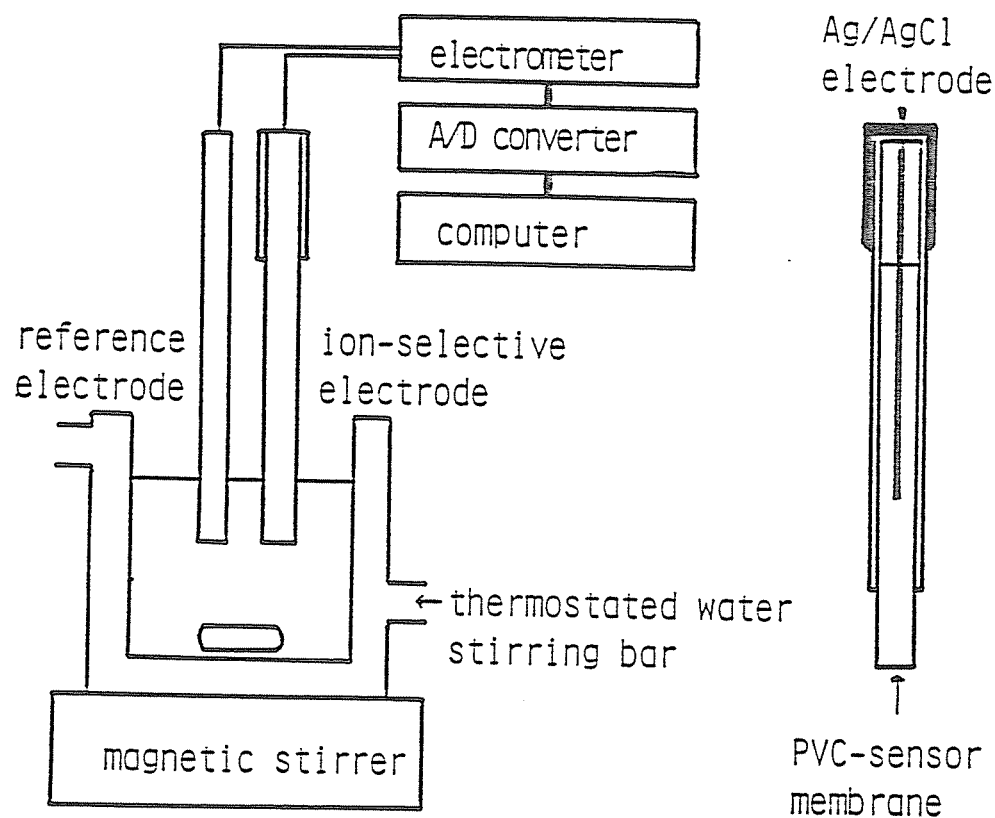


図2-3 脂溶性イオン選択性電極の構造と測定装置の略図

脂溶性イオン選択性電極は 5×10^{-7} Mから0.1 MまでNernst応答する。この電極と参照電極間に発生する電極電位をコンピュータに入力した。電位の経時変化はディスプレイにグラフィック表示して観測し、同時に吸着量の演算を行なった。

着による測定液中のfreeに存在するプローブ濃度の減少。(1)の効果は $(RT/F)\ln((V_0 + V_1)/V_0)$ として計算できる。従って単位脂質あたりの吸着量 U_b (mol/mg) は次式から求められる。

$$U_b = (C_0 V_0 / P V_1) [1 - \exp(-F \Delta E_a / RT)] \quad (2-1)$$

ここで $\Delta E_a = \Delta E - (RT/F)\ln((V_0 + V_1)/V_0)$ である。吸着平衡でfreeに存在するプローブ濃度 C は $C = C_0 \exp(-F \Delta E / RT)$ より計算できる。また吸着量は2-1 式からわかるように、 $C_0 V_0 [1 - \exp(-F \Delta E_a / RT)]$ (mole) である。この値はリポソーム量に比例した。従って吸着量はmole量を全リポソーム量で割った値 U_b で表わした。

2-3-2 電子スピン共鳴 (E S R) による方法

脂溶性イオンにスピンラベルしたプローブ (probe I, II, III、2-1 緒言参照) を使用し、Cafiso と Hubbell の方法 [6] で解析した。E S R 測定は JES-FE3X (Nihon Denshi, Tokyo) で行なった。マイクロ波 9.20 GHz (出力 5 mW), modulation amplitude 100 KHz, 1 G, field $3290\text{G} \pm 50\text{G}$ 、測定温度は窒素気流で control した。

図2-4 にスピンプローブの E S R スペクトルを示す。ニトロキシドラジカルの超微細構造によりスペクトルは 3本に分裂する。破線はプローブ N_0 mole がすべて水溶液中でfreeに存在しているときのスペクトルである。高磁場側のシグナルの高さ H_f° は, freeに存在しているスピンプローブ量 N_0 に比例し、 $N_0 = \beta H_f^\circ$ が成立する。実線はリポソーム存在下で測定したスペクトルである。プローブはリポソームに吸着すると分子運動が束縛されるためスペクトルは高磁

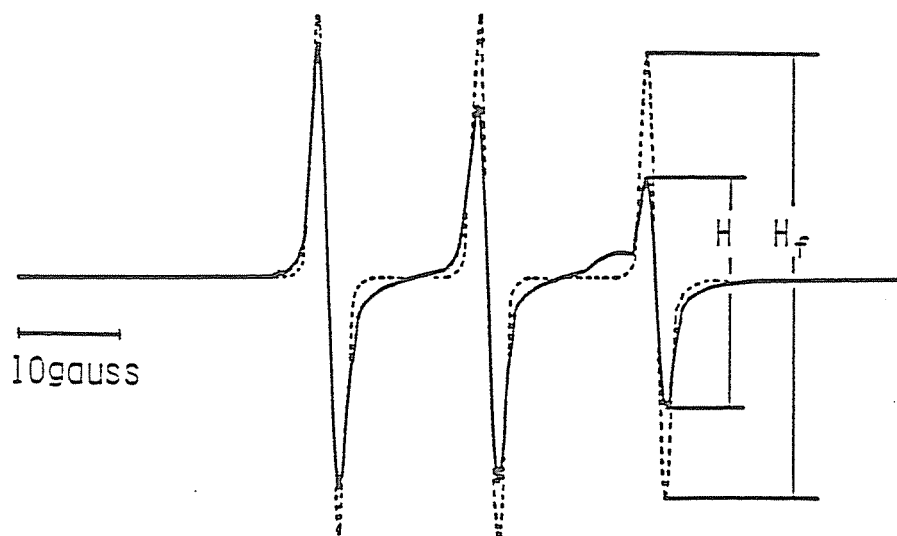


図2-4 スピンラベルした脂溶性イオンのESRスペクトル

ニトロキシドラジカルは3本のシグナルに分裂する。(---)プローブがすべて水溶液中にfreeに存在するときのスペクトル。(—)リポソーム存在下でのスペクトル。リポソームに吸着したプローブは自由回転が束縛されるためシグナルはブロードになる。高磁場側のシグナル高さ H_f , H から2-3 式で吸着量が求まる。

場側程ブロードになる。高磁場側のシグナルの高さ H は水溶液中に free に存在するプローブによるシグナル H_f と、リポソームに吸着したプローブによるシグナル H_b の和となる。

$$H = H_f + H_b \quad (2-2)$$

シグナル H_b, H_f は各々の領域のプローブ量に比例し、それぞれ $N_b = \alpha H_b$, $N_f = \beta H_f$ で示される。 α , β はそれぞれ比例係数である。吸着量 N_b (mole)は全プローブ量 N_0 から free に残っているプローブ量 N_f を引いた量である。

$$N_b = N_0 - N_f \quad (2-3a)$$

また2-3a式は $N_0 = \beta H_f^\circ$, $N_b = \alpha H_b$, $N_f = \beta H_f$ で書き換えると $\alpha H_b = \beta H_f^\circ - \beta H_f$ であり、この式を2-2式に代入すると

$$H_f = (H - H_f^\circ \beta / \alpha) / (1 - \beta / \alpha) \quad (2-3b)$$

である。吸着量 N_b (mole)はシグナルから H を測定し、2-3b式で H_f を求め、2-3a式から算出する。比例係数 β, α は予め求めておいた。 β はプローブのみが存在する状態で $N_0 = \beta H_f^\circ$ から求めた。 α はリポソームにプローブがすべて吸着した状態のシグナルが必要であるが実験上は実現できないので、リポソーム存在下のシグナルの高さ H を測定し、リポソーム濃度の逆数に対するプロットから縦軸に外挿して求めた。また吸着量は B (mol/mg lipid) で表わした。

2-4 結果と考察

2-4-1 リボソームへの脂溶性イオン吸着

脂溶性イオン選択性電極を用いて吸着量を求めた。DPPCリボソームへの脂溶性イオンの吸着等温線を図2-5 に示す。吸着量はTPMP⁺< TPEP⁺< TPBP⁺< TPP⁺< TPAP⁺の順であり、この序列をTPMP⁺の同族体の構造と比較すると、アルキル基の長さの順と一致している。リボソームへの吸着量はプローブの脂溶性に関連していると考えられる。プローブ濃度が高くなると、いずれのプローブでも飽和吸着現象が現われる。このような吸着現象はLangmuir型の吸着等温式で取り扱うことができる。

$$U_b = AC/(K + C) \quad (2-4)$$

ここで Aは最大吸着量、 Kは解離定数である。2-4 式を変形すると次式が得られる。

$$C/U_b = K/A + C/A \quad (2-5)$$

この式によりC/U_bを Cに対してプロットすると、直線関係になる。(Dixon plot[7])。図2-6 は吸着量を2-5 式に従ってプロットしたものである。どのプローブもほぼ直線で示すことができる(ただしTPMP⁺, TPEP⁺についてはばらついている)。表2-1 は非線形最小二乗法で決定した各プローブの吸着定数K, A である。吸着量の多いプローブほど Kが小さい。すなわちリボソームとプローブとの親和性

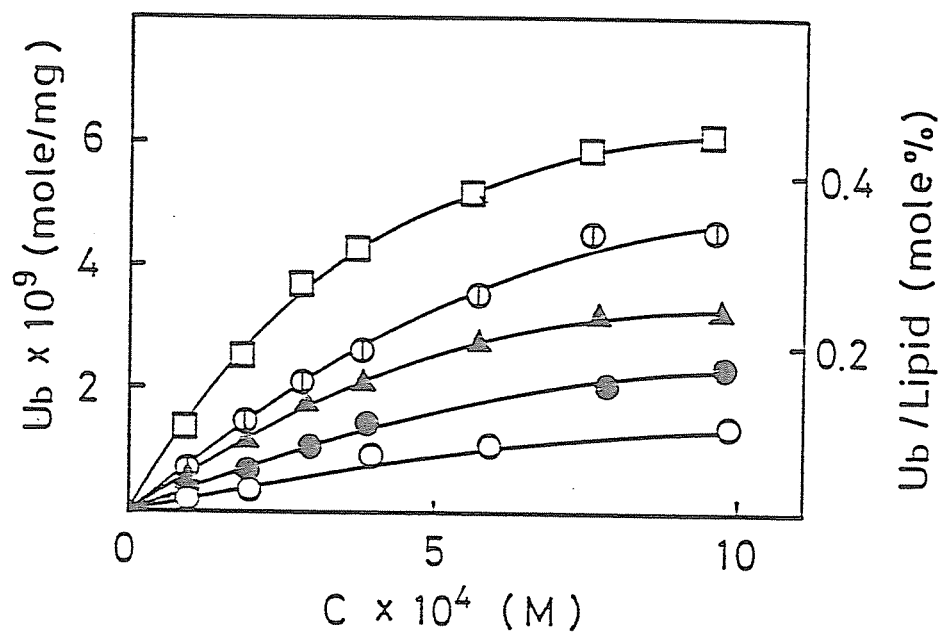


図2-5 DPPCリボソームへの各種脂溶性イオンの吸着等温線

測定液：100 mM NaCl, 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.0)、測定温度：30°C

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺

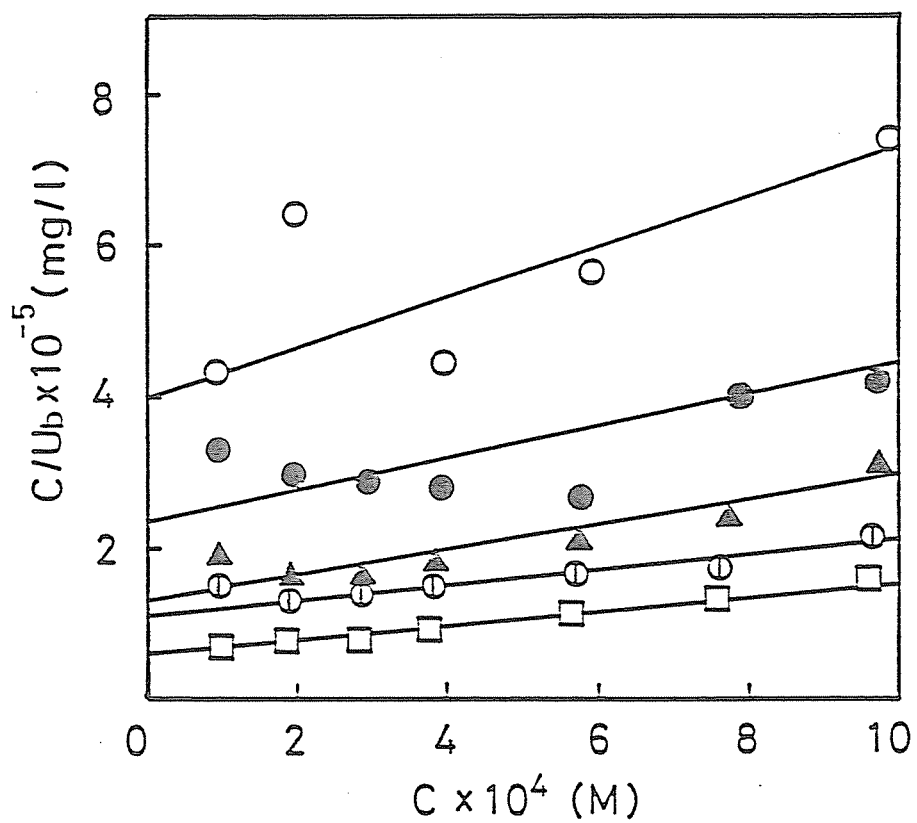


図2-6 C/U_b 対 C プロット。2-5式に従って図2-5 をプロットした。 $\circ$, TPMP⁺ ; $\bullet$, TPEP⁺ ; $\blacktriangle$, TPBP⁺ ; $\square$, TPAP⁺ ; $\odot$, TPP⁺

表2-1 DPPCリポソームへの各種脂溶性イオンの吸着定数(30°C)

K, A は 2-4式から非線形最小二乗法（付録-B）で決定した。

PROBE	K (mol/l)	A (mol/mg)
TPMP+	$1.05 \cdot 10^{-3}$	$2.84 \cdot 10^{-9}$
TPEP+	$9.46 \cdot 10^{-4}$	$4.84 \cdot 10^{-9}$
TPBP+	$6.56 \cdot 10^{-4}$	$5.60 \cdot 10^{-9}$
TPAP+	$4.62 \cdot 10^{-4}$	$9.25 \cdot 10^{-9}$
TPP+	$1.08 \cdot 10^{-3}$	$1.00 \cdot 10^{-8}$

は脂溶性が高いほど大きくなることを示している。

図2-7 はE S Rより求めたprobe IIのegg lecithinリポソームへの吸着等温線である。5, 15, 25, 35°Cの温度での結果は、図2-5と同様にLangmuir型である。図2-8はprobe IIについてDixon plotしたグラフである。このプロットの直線性は良好で、最小二乗法で求めた決定係数は、0.991である。他の測定温度についても同様の結果であった。表2-2Bにprobe IIの吸着定数 K, A をまとめた。egg lecithinリポソームへの吸着量は温度が上がると増加するが、 K 値は温度依存性があまり大きくない。このような吸着現象はprobe Iについても同様であった(表2-2A)。

probe IIIの20°Cでの測定結果を図2-9に示す。probe IIIはprobe I, IIに比べ脂溶性が高く、吸着量は非常に多い。吸着等温線をDixon plotで表わしたのが図2-10である。他のプローブの吸着と異なりprobe IIIでは直線関係が2成分からなる。これはリポソームとprobe IIIの系では高親和性と低親和性のふたつの吸着サイトが存在することを示唆する。このような吸着は20°C以外でも同じであった。各温度での吸着定数を高親和性と低親和性に分けて求めた結果を表2-3に示す。高親和性吸着サイトの K, A はともに温度を変えても変化しない。一方、低親和性吸着サイトではパラメータの温度依存性はわずかにある。

これまで膜電位プローブとして使用されてきた脂溶性イオンの吸着に関する熱力学量は報告されていない。吸着量測定から求められた解離定数 K の温度変化から熱力学的解析を行なった。

温度 T , 圧力 P 一定の条件で吸着に伴う自由エネルギー変化 ΔG は次式で表わされる。

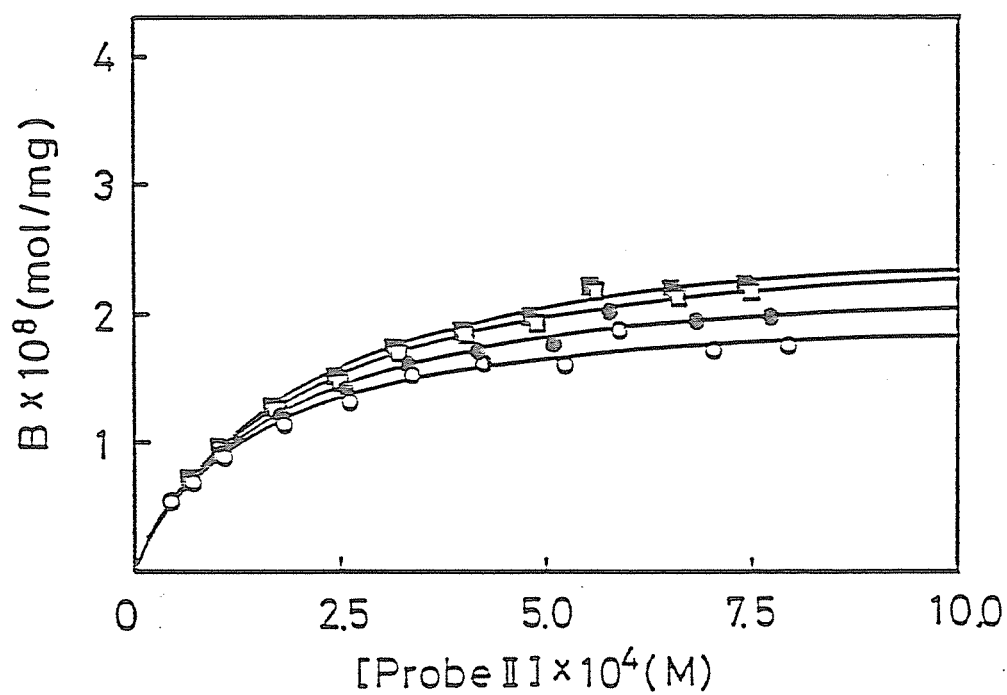


図2-7 Egg lecithinリポソームへの probe II の吸着等温線

測定液：100 mM NaCl, 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.0)、

測定温度：○, 5°C ; ●, 15°C ; □, 25°C ; ■, 35°C

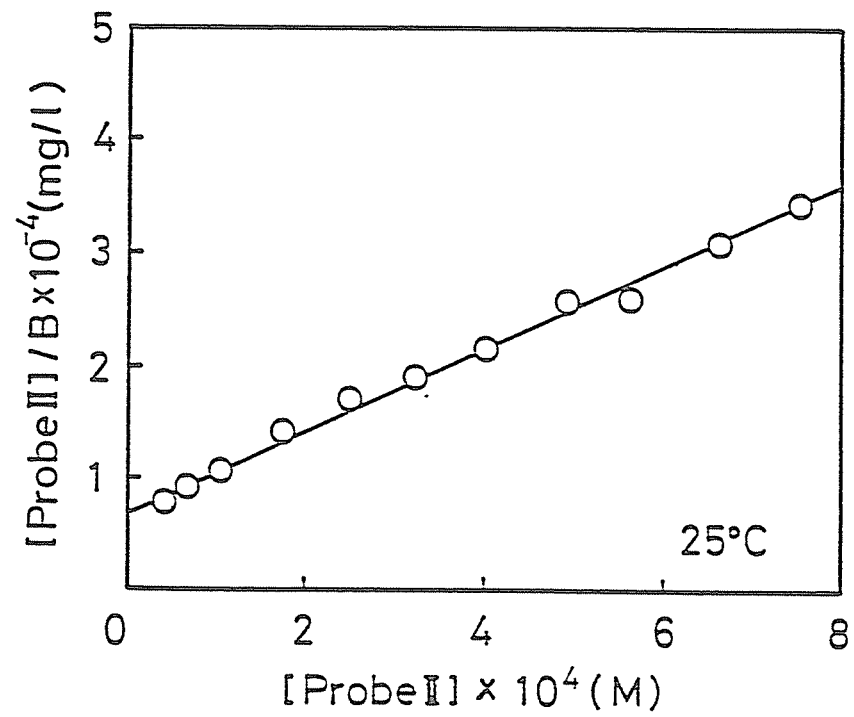


図2-8 C/B 対 C プロット。Egg lecithinリポソームへの probe II の吸着を 2-5式に従ってプロットした。測定温度:25 °C

表2-2A Egg lecithinリポソームへの probe Iの吸着定数

K, A は 2-4式から非線形最小二乗法で決定した。

T (°C)	K (mol/l)	A (mol/mg)
5	$1.18 \cdot 10^{-3}$	$8.43 \cdot 10^{-8}$
15	$1.29 \cdot 10^{-3}$	$1.64 \cdot 10^{-7}$
25	$1.12 \cdot 10^{-3}$	$1.70 \cdot 10^{-7}$
35	$1.28 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-7}$

表2-2B Egg lecithinリポソームへの probe II の吸着定数

K, A は 2-4式から非線形最小二乗法で決定した。

T (°C)	K (mol/l)	A (mol/mg)
5	$1.34 \cdot 10^{-4}$	$2.08 \cdot 10^{-8}$
15	$1.58 \cdot 10^{-4}$	$2.39 \cdot 10^{-8}$
25	$1.79 \cdot 10^{-4}$	$2.69 \cdot 10^{-8}$
35	$1.81 \cdot 10^{-4}$	$2.76 \cdot 10^{-8}$

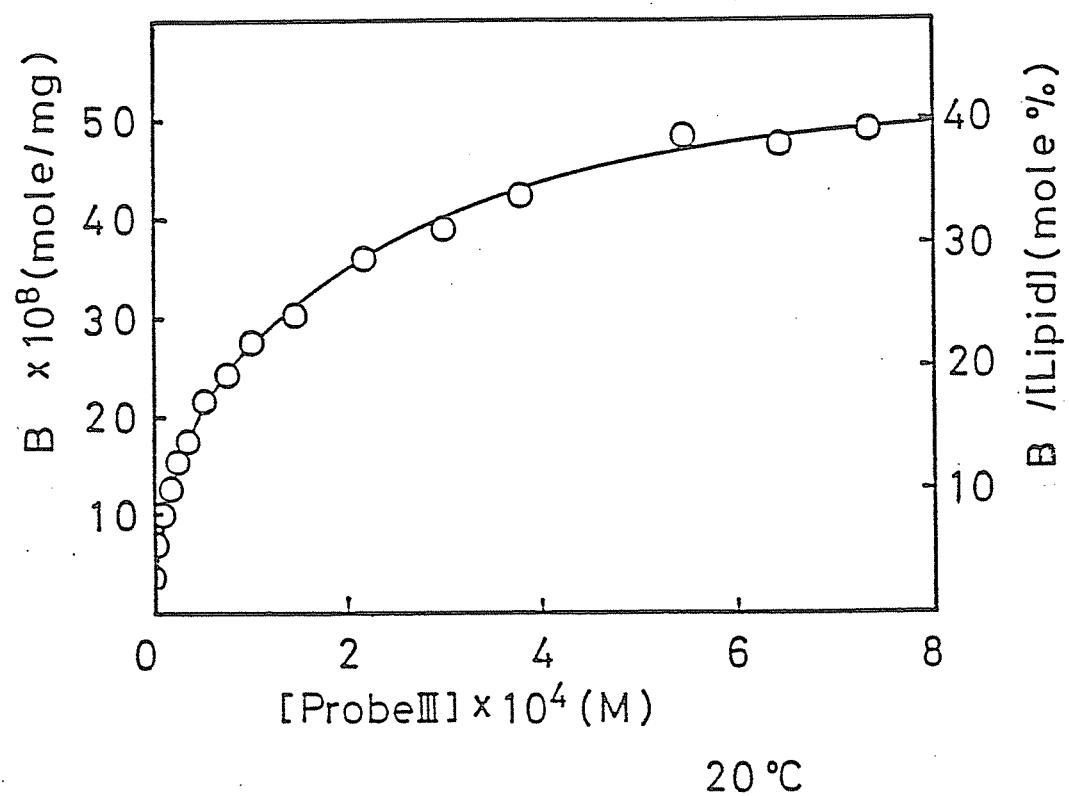


図2-9 Egg lecithinリボソームへの probeⅢの吸着等温線

測定液：100 mM NaCl, 10 mM HEPES/NaOH (pH 7.0)、測定温度：20°C

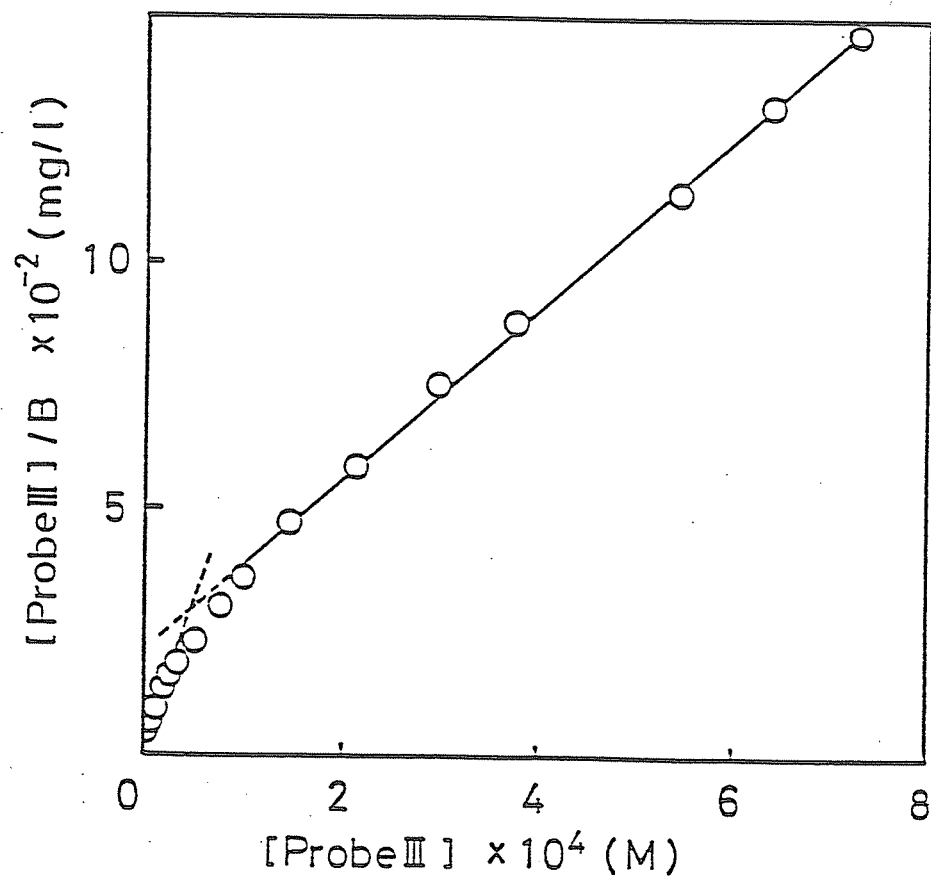


図2-10 C/B 対 C プロット。Egg lecithinリポソームへの probe Ⅲの吸着を 2-5式に従ってプロットした。測定温度:20°C

表2-3 Egg lecithinリボソームへの probe III の吸着定数

測定液：100 mM NaCl, 10mM HEPES/NaOH(pH 7.0)。K, Aは2-5式から決定した。

T(°C)	K (mol/l)		A (mol/mg)	
	HIGH	LOW	HIGH	LOW
5	$6.62 \cdot 10^{-6}$	$7.64 \cdot 10^{-5}$	$1.72 \cdot 10^{-7}$	$4.72 \cdot 10^{-7}$
10	$6.37 \cdot 10^{-6}$	$8.52 \cdot 10^{-5}$	$1.70 \cdot 10^{-7}$	$4.97 \cdot 10^{-7}$
15	$6.31 \cdot 10^{-6}$	$1.06 \cdot 10^{-4}$	$1.71 \cdot 10^{-7}$	$5.43 \cdot 10^{-7}$
20	$5.82 \cdot 10^{-6}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$	$1.67 \cdot 10^{-7}$	$5.73 \cdot 10^{-7}$
25	$5.75 \cdot 10^{-6}$	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$1.67 \cdot 10^{-7}$	$5.83 \cdot 10^{-7}$
30	$5.76 \cdot 10^{-6}$	$1.26 \cdot 10^{-4}$	$1.66 \cdot 10^{-7}$	$5.88 \cdot 10^{-7}$
35	$5.94 \cdot 10^{-6}$	$1.16 \cdot 10^{-4}$	$1.68 \cdot 10^{-7}$	$5.75 \cdot 10^{-7}$
40	$6.26 \cdot 10^{-6}$	$1.25 \cdot 10^{-4}$	$1.71 \cdot 10^{-7}$	$5.81 \cdot 10^{-7}$

HIGH = HIGH AFFINITY. LOW = LOW AFFINITY.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (2-6)$$

ここで ΔH はエンタルピー変化、 ΔS はエントロピー変化である。
 $\Delta G, \Delta H, \Delta S$ はそれぞれ

$$\Delta G = RT \ln K \quad (2-7)$$

$$\Delta H = R d(\ln K)/d(1/T) \quad (2-8)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (2-9)$$

で求まる。図2-11は各プローブの K の対数を温度の逆数でプロットした結果である。probe III は高親和性吸着サイトに関する K についてプロットした。どのプローブでもスロープはほぼゼロであることから、 $\Delta H = 0$ である。表2-4 に各プローブの吸着の熱力学量をまとめた。 ΔG は吸着のしやすさを表わす尺度である。表2-4 からわかるように $-\Delta G$ は $I < II < IIIb < IIIa$ の関係があり、比較的脂溶性が低いと考えられる probe I が最も小さく、probe III の高親和性サイトが最も大きい。 ΔG は ΔH 項と $T \Delta S$ 項からなる。 ΔH については図2-9 から明らかにになったように I, II, IIIa ではゼロである。probe III の低親和性サイトの ΔH は負値であり、 ΔG の約40%を占める。一方、 ΔS はいずれも大きく増加している。すなわちリボソームへの脂溶性イオンの吸着に伴う ΔG には、 ΔH よりも $T \Delta S$ 項の寄与が支配的であり、吸着前後のエントロピー変化が吸着の主な原因といえる。

一般に水相から非極性溶媒相への電荷を持たない脂溶性物質の移

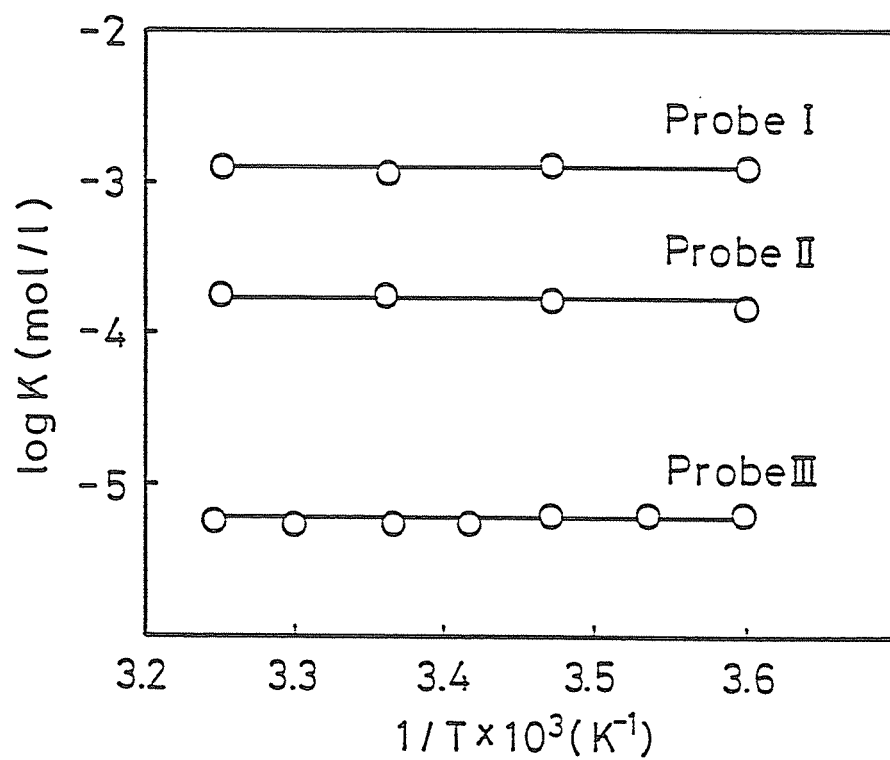


図2-11 $\log K$ 対 $1/T$ プロット。probeⅢは高親和性吸着サイトの K でプロットした（表2-3 参照）。

表2-4 各プローブのegg lecithinリポソームへの吸着に関する熱力学量(25°C)。 ΔG , ΔH , ΔS はそれぞれ2-7, 2-8, 2-9 式で計算した。probe IIIは (a)高親和性吸着サイトと (b)低親和性吸着サイトに分けて計算した。

PROBE	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol·deg)
I	-4.0	0	+13.5
II	-5.1	~ 0	+17.1
III a	-7.1	0	+23.9
III b	-5.3	-2.3	+10.1

a) high affinity binding site.

b) low affinity binding site.

行はエントロピー変化に起因していると理解されている[8, 9, 10, 11]。脂溶性物質が水相に存在している状態では、そのまわりの局所的な水の構造化がすすむ。この場合水の秩序性が高くなり、エントロピーは減少する。この状態は脂溶性物質にとってエントロピー的に不利である。移行の ΔG のうちエンタルピー項よりもエントロピー項が上まわるほど大きければ脂溶性物質の水相から非極性溶媒相への移行が起こる。この現象は疎水性効果と呼ばれる。Kauzmann[9]はアルカン類と芳香族について水相から非極性溶媒相への移行の熱力学量を求めている。いずれも ΔS の寄与が大きいこと、また ΔH はアルカン類ではゼロでないが芳香族ではゼロであることを示している。水からsodium dodecyl sulfate (SDS)ミセル内へのアルカン類の移行の熱力学量の測定がWishnia[12]によってなされている(表2-5 参照)炭素鎖がある程度配向しているミセル系では均一な非極性溶媒相に比べて移行の ΔG はわずかに小さくなる。これは移行エントロピーが小さくなっているためである。またアルカン分子が大きくなるにつれて ΔH の符号が変わる。分子サイズによって水との接触界面が変化し、水構造の安定性に影響していると考えられている。

脂溶性物質が電荷を持つ場合、リポソームへの吸着力としてふたつ考えられる。ひとつは電荷による静電的相互作用、他はこれまで述べて来た疎水性相互作用である。probe I, II, IIIのリポソームへの吸着がエントロピー変化 ΔS によって支配されている結果から、吸着力に寄与しているのは疎水性効果であるといえる。ただしprobe IIIのように吸着量が多い場合、吸着にエンタルピーの寄与が現われる。probe IIIの最大吸着量はprobe I, IIに比べて一桁以上多く、

表2-5 水からのアルカン類移行の熱力学量 [Wishnia, 12]

A; 水から均一非極性溶媒へのアルカン類移行の熱力学量

B; 水から SDS ミセルへのアルカン類移行の熱力学量

A	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol·deg)
Ethane	-3.90	---	---
Propane	-4.85	2.0	+23
Butane	-5.82	1.0	+23
Pentane	-6.62	---	---
B	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol·deg)
Ethane	-3.45	2.00	+18.3
Propane	-4.23	1.00	+17.5
Butane	-5.13	0.0	+17.2
Pentane	-5.72	-1.08	+15.6

egg lecithinとのモル比で40%に達する。egg lecithinは中性脂質であり極性基の電荷は電氣的に中和されている。しかしながらカチオン性のprobe IIIがリボソーム内で多くなれば、静電的相互作用は無視できない。probe IIIに関するエンタルピーの効果が静電的なものなのか、あるいは他の効果たとえば水の構造変化、リボソームの組成変化に起因するのかは明らかではない。

2-4-2 脂溶性イオンの吸着サイト

リボソームに吸着した脂溶性イオンの膜内での存在位置を明らかにするため、ESR測定から得られるスピンスピン交換相互作用を利用する方法を考案した。スピンスピン交換はすでに知られている現象[13,14]で、試料内のラジカル間距離が近いときの相互作用のひとつである。これはふたつのラジカル間でスピンドウシの相互作用があると、それぞれのスピンスペクトルが互いに変化する現象をいう。ニトロキシドラジカルの超微細構造は、電子スピンの核スピンの内部磁場に3種類の状態があるためである。この状態に電子スピンのまわりの内部磁場を乱す条件をつくりだすと、ESRスペクトルが変化する。この条件は外部からスピンを接近させることで実現できる。すなわちスピン間の距離が短くなると、局所的な内部磁場に影響するために、3本線の線幅が増大しスペクトルのシグナル高さが減少する。これをexchange broadeningという。従ってスピンドウシの距離がシグナルの高さから推定できる。

リボソーム膜内部での脂溶性イオンの厚さ方向の存在位置（深さ）を測定するには、上述の原理に基づいてふたつのスピンプローブを用いる。ひとつは脂溶性イオンにスピンラベルしたprobe I、もうひとつはn-doxylstearic acid (nDSA)である。nDSAは脂質膜の流動性を測るためのプローブとしてしばしば用いられる。これをリボソームに組み込むことによって、膜の表面から一定の深さにスピンラベルすることができる。またスピンの深さはカルボニル基からの炭素数nを変えることで、種々のものが得られる。これらのプローブ

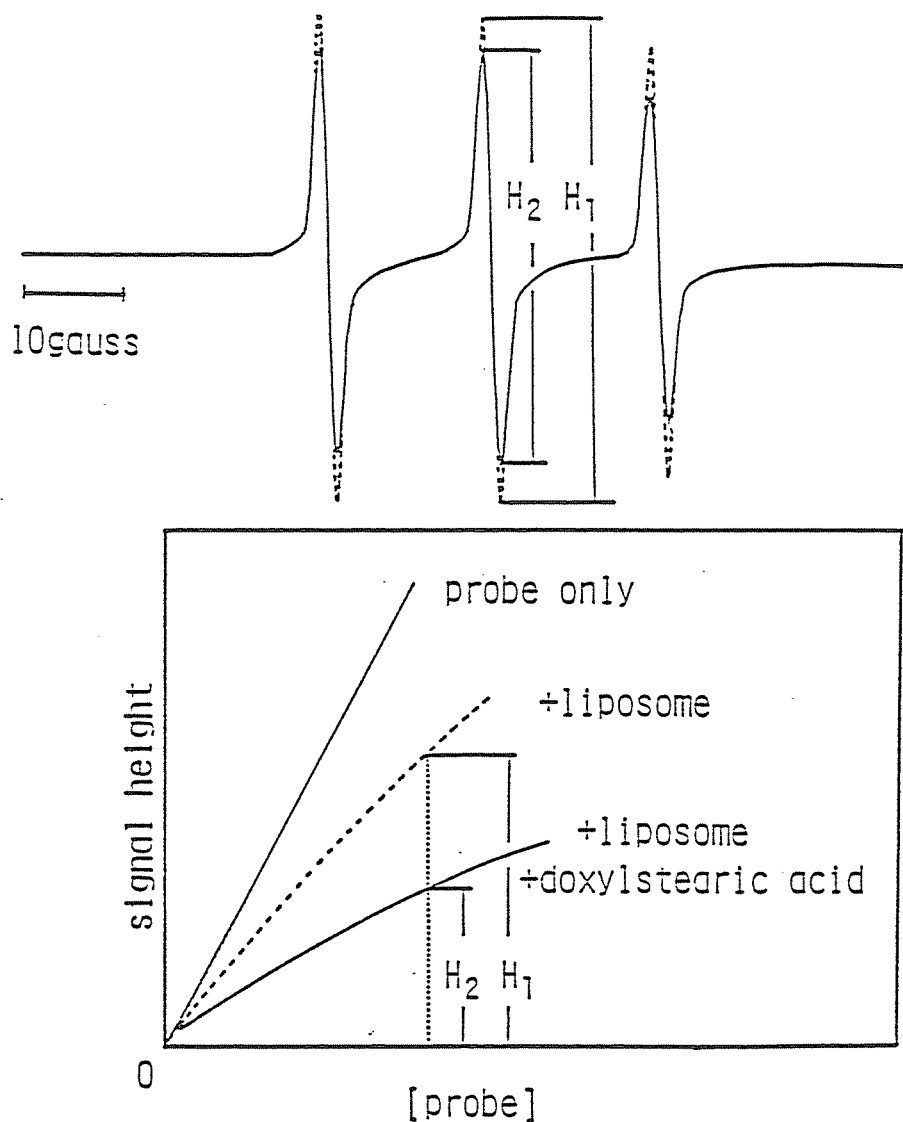


図2-12 スピンスピン交換相互作用によるESRスペクトルの変化。A; (----)リポソーム存在下、(——)nDSAを含んだリポソーム存在下でシグナルが減少、B; probeI濃度と中央シグナル高さの関係。probeIのみでは比例関係、リポソーム存在下ではプローブ吸着のために勾配は減少(H_1)、nDSAを含んだリポソーム存在下ではさらに減少(H_2)する。 H_2/H_1 をRelative heightとする。 n の異なるnDSAを含んだリポソームではRelative heightが小さいリポソームほどnDSAと吸着したプローブが接近している。

のスピン-スピン交換から、吸着したprobe I の膜内位置をつぎの方法で推定した。図2-12にスピン-スピン交換相互作用のため得られるシグナル強度を模式的に表わした。図2-12B はprobe I の濃度を変えて中央シグナルの高さH を測定した例である。probe I が水溶液中ですべてfreeであるとき、シグナルH はprobe I の濃度に比例する。リポソーム存在下（破線）では、濃度増加によるシグナルH₁の増加は小さくなる。これはリポソームにプローブが吸着したことによる。nDSA を一定量含んだリポソーム存在下（nDSA の濃度はprobe I より少なく、またほとんどが膜中に存在するためシグナルはprobe I に比べてはるかに小さい）では、nDSAを含まないリポソームの場合よりさらにシグナルH₂は低下する。これは膜内のスピンどうしの交換相互作用による。任意のprobe I の濃度でのH₂/H₁ をRelative height とする。H₂/H₁ が小さくなるほど、吸着しているprobe I と nDSAのスピンとのスピン間距離が近いことを表わす。

図2-13は 膜内のスピンラベルの深さをいろいろ変えたりポソームを用いて、Relative height の変化を測定した結果である。probe I とn DSAのスピン-スピン相互作用がないとき、Relative height は 1となる。3DSA,5DSA,7DSA,12DSAをそれぞれ含んだリポソームについて比較すると、probe I の濃度を増加するに従って、いずれもRelative heightは減少傾向である。この中でとくに3DSAの場合が著しく低下していることがわかる。この結果はprobe I のスピンと最も接近しているnDSAのスピンは、3DSAの場合であることを示す。

probe I の分子内のニトロキシドラジカルとホスフォニウムイオン間の長さから推定すると、ホスフォニウムはちょうど脂質の極性基、すなわち膜の表面付近であると考えられる。

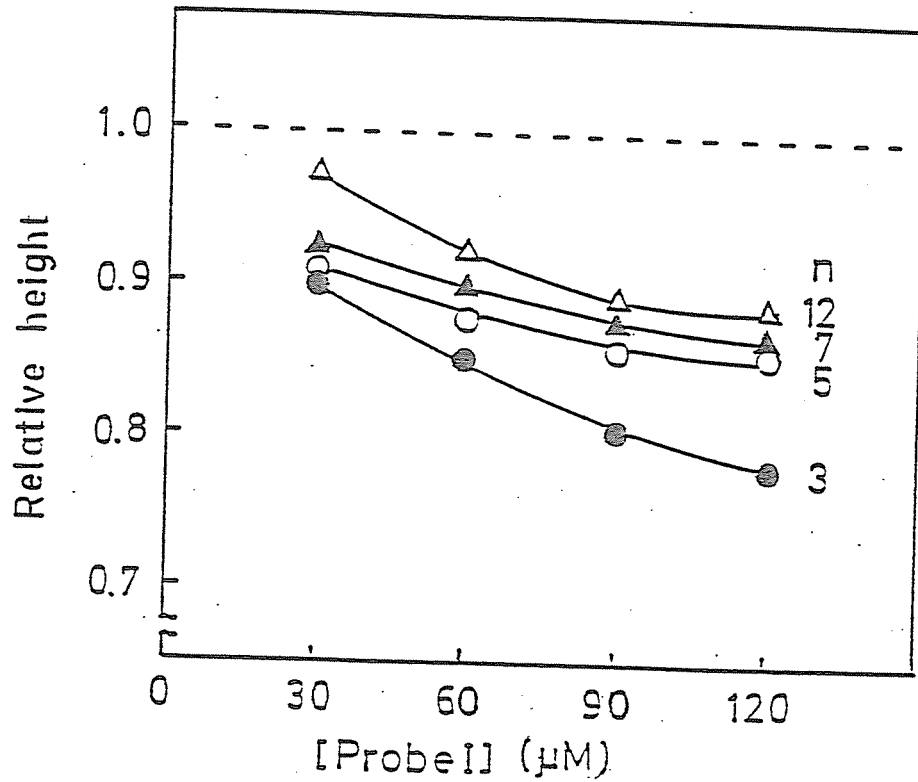


図2-13 nDSAを含んだリポソームのRelative height とprobeIの濃度の関係。egg lecithinリポソーム(10 mg lipid/ml) , nDSA(30 μ M、nDSAはほとんど吸着しているので、probe I の同じスピン量に比べて数%のシグナル強度である)。

●,3DSA ; ○,5DSA ; ▲,7DSA ; △,12DSA

脂溶性イオンが脂質膜内でどのように分布しているかという問題は、これまで理論的には推定されていた。Benzら[17]は、黒膜の tertraphenylboron(TPB⁻) の透過を charge-pulse relaxation から解析し、実験結果をよく説明する透過機構モデルはTPB⁻が膜の表面に存在する場合であると推定した。また最近、Altenbach と Seelig [15]は脂質極性基を選択的に重水素化し、核四極子分裂がTPP⁺の吸着によって変わること示した。これはTPP⁺が極性基付近に存在することと矛盾しない。これらの報告では脂溶性イオンが膜の表面付近に存在することに関しては支持するが、膜の中央部に関して直接的な情報は得られていなかった。本研究はこの点について重要な結果を与える。すなわち、膜内のスピンスピン交換が 5DSA, 7DSA, 12DSA ではいずれも3DSAに比べて起こりにくいという結果は、膜中央部には脂溶性イオンのprobe I が存在しない(E S Rの観測時間内)か、もしくは膜表面よりはるかに少ないことを示している。

2-4-3 脂溶性イオンの吸着と脂質の相転移

DPPCリポソームは41°C付近に相転移温度(T_c)がある。T_cより低温側では脂質アシル基の配向性は高く、結晶状態にある。T_cより高温側では液晶状態となり、流動性が増す。図2-14はDPPCリポソームへのprobe IIの吸着量の温度変化である。吸着量は相転移温度以上で急激に増加する。図2-15は2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) のTEMPO factorの温度変化をDPPCリポソームで測定したものである。測定条件はprobe IIと同じである。TEMPO は脂質の流動性測定のプロブとしてよく使用される。TEMPO factorは水相から脂質相への TEMPO の分配係数にほぼ比例する値で、factor が大き

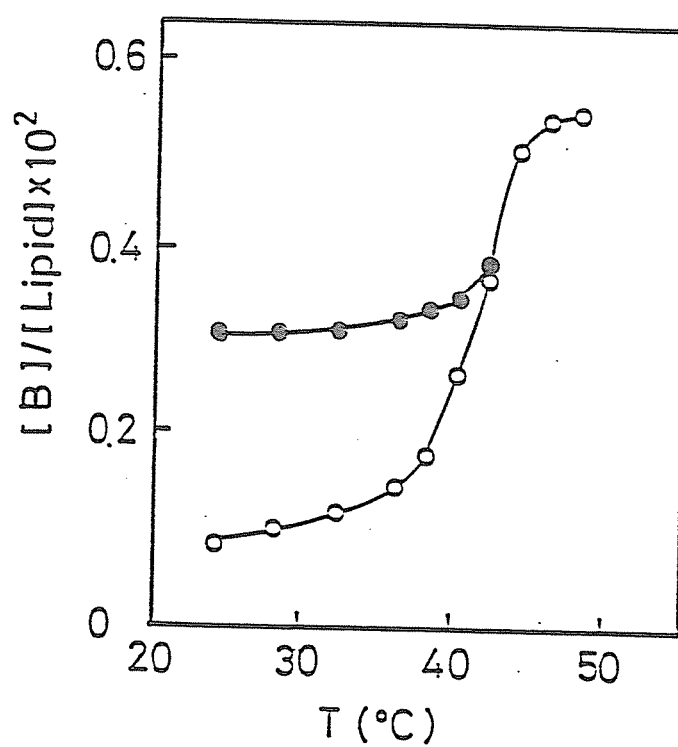


図2-14 DPPCリポソームへの probe II 吸着の温度変化
 リポソーム(100 mg lipid/ml)、 probe II (100 μ M)。
 ○,昇温過程(1 °C/min)、●,降温過程(1 °C/min)

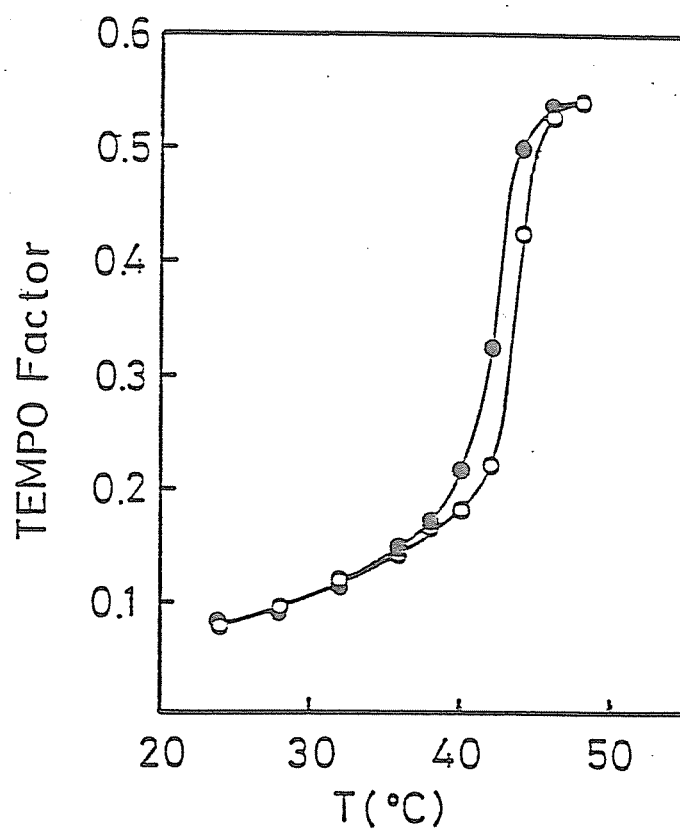


図2-15 DPPCリポソームのTEMPO factorの温度依存性、
TEMPO factorは水相から脂質相への TEMPO の分配係数に比例する
値である。

リポソーム(100 mg lipid/ml)、TEMPO (30 μ M)。

○,昇温過程(1 °C/min)、●,降温過程(1 °C/min)

いほど、膜相へ溶け込んだ量が多いことを表わす。膜相に存在するプローブ量の相転移温度での急激な変化はprobe II, とTEMPO で同じであるが、相転移温度以下の挙動がことなる。TEMPO では昇温過程と降温過程でfactorは同様な変化を示す（ただし相転移温度付近でヒステリシスがみられる）。これに反し、probe IIの昇温過程と降温過程では相転移温度以下で吸着量が約2倍の差がある。この原因はプローブの透過性の違いによると考えられる。相転移温度以下でリポソームに添加されたprobe IIは、結晶状態の膜の透過性が低く、最初外部表面に主に吸着し、全吸着サイトの約半分を占めている。相転移温度以上へ昇温し、液晶化が起こるとリポソーム内部への透過性が増し、内部表面への吸着が起こりやすくなると考えられる。一方TEMPOは電荷を持たないので、脂溶性イオンより膜中央部に分配しやすく、脂質二分子膜を透過するための膜内ポテンシャル障壁がないためであろう。

図2-16はDPPCリポソームへの各種脂溶性イオンの吸着量を45°Cで測定した結果である（30°Cでの結果は図2-5 参照）。これらの脂溶性の異なる一連のプローブについても相転移温度以上の45°Cで、吸着量が増加する。最大吸着量 A を30°Cと45°Cで比較した。図2-17はTPMP⁺の同族体について A の増加率 $[= A(45^{\circ}\text{C})/A(30^{\circ}\text{C})]$ とプローブの炭素鎖長の関係をプロットしたものである。炭素鎖の長いプローブほど増加率は大きくほぼ比例している。このプローブのなかでTPMP⁺が1を下まわっている。つまり相転移温度以上で最大吸着量が減少する。解離定数 K の30°Cから45°Cへの増加率は、TPMP⁺=0.6, TPEP⁺=2.3, TPBP⁺=2.7, TPAP⁺=3.0であった。TPEP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺では同程度の増加率である。一方TPMP⁺は減少した。脂質の結晶状

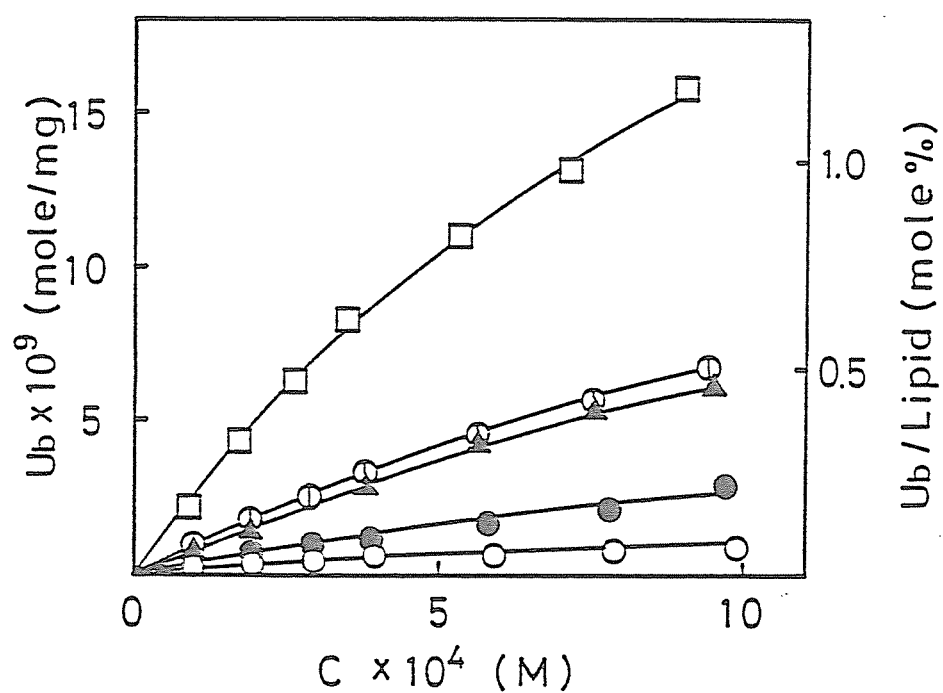


図2-16 DPPCリポソームへの各種脂溶性イオンの吸着等温線

測定温度：45°C。他の測定条件は図2-5 と同じ。

$\circ$, TPMP⁺ ; $\bullet$, TPEP⁺ ; $\blacktriangle$, TPBP⁺ ; $\square$, TPAP⁺ ; $\odot$, TPP⁺

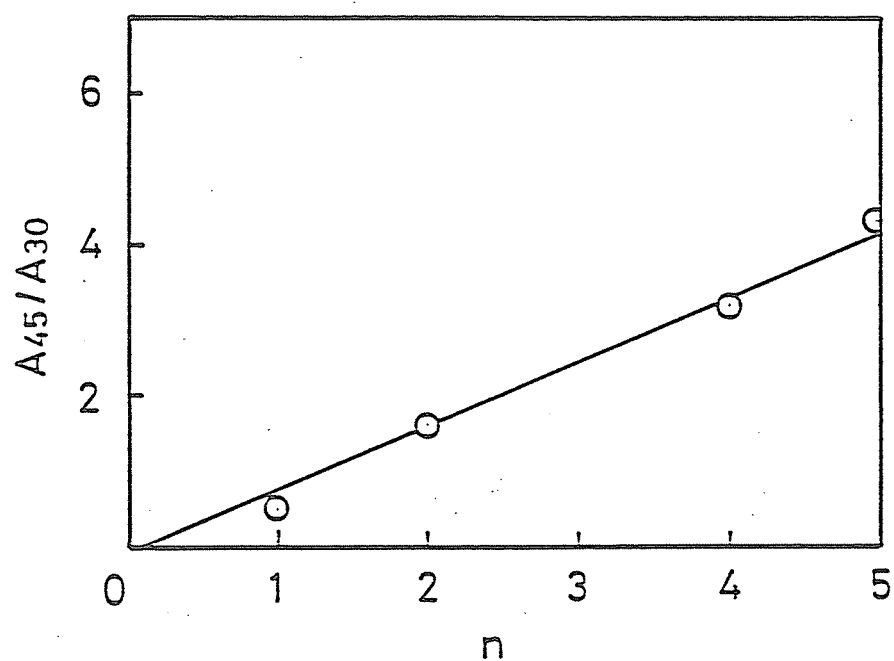


図2-17 DPPCリポソームへの脂溶性イオン最大吸着量A の温度変化
 縦軸は $A(45^{\circ}\text{C})$ と $A(30^{\circ}\text{C})$ の比、横軸は $(\text{Phe})_3\text{-P}^+\text{-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$
 の炭素数 n である。

態から液晶状態への相転移に伴って脂溶性イオンの吸着量が増加することの原因として、定性的に次のように考察できる。脂質相の状態が温度で変化するとき、TPEP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺ では K は温度変化に対し同程度の増加率であるにもかかわらず吸着量はプローブの脂溶性にしたがって増加しやすくなる。この結果は、脂質の相転移に対応した吸着変化は最大吸着量 A の変化と関連していると考えられる。

probe III は炭素数12のアルキル基を持つ脂溶性イオンであるため egg lecithin への吸着にたいする疎水性効果が大きいことを示した (図2-9 参照)。図2-18はDPPCリポソームへのprobe IIIの吸着等温線である。egg lecithinの場合と吸着量のオーダーは同じである。相転移温度以上(45°C)での吸着量が最も多く、20°Cから温度が上昇するに従って徐々に吸着量が増加する。またこの吸着曲線は相転移温度以下において、プローブ濃度を増加させると吸着量が急激に増加する濃度があることがわかる。この濃度は測定温度が高いほど低濃度側にシフトする。図2-14では脂質の相転移温度に対応して吸着量が急激に増加することを示した。2-18図では吸着量が多くなると、相転移温度(約41°C)以下で吸着量の急激な増加がみられ、相転移温度が低下していると考えられる。図2-19はDPPCリポソームサスペンションの90°光散乱強度の温度変化を測定した結果である。相転移に伴い、リポソームの体積あるいは屈折率は急激に変化する。このため光散乱強度は相転移温度で減少する。脂溶性イオンが存在していないときは、相転移温度は41.4°Cであるが、脂溶性イオンを添加すると、相転移温度が変化する。0.5 mM の脂溶性イオンを添加したときの光散乱変化から求めた相転移温度を表3-6 にまとめた。

probe III では31°Cに低下している。また SDSはprobe IIIと同じ長さ

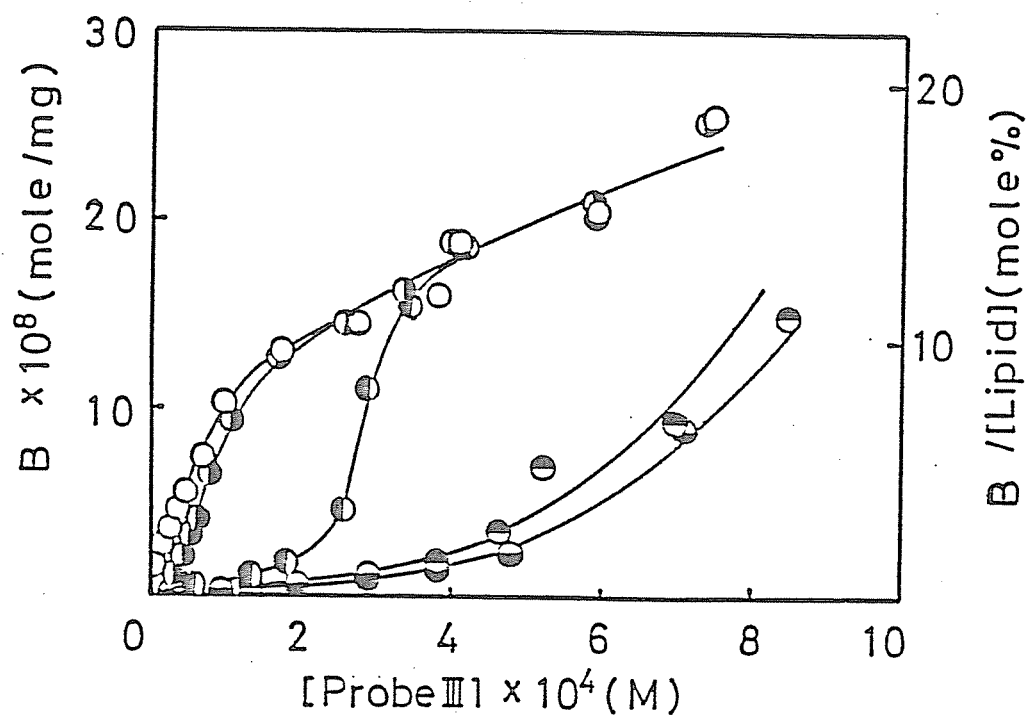


図2-18 DPPCリポソームへの probeⅢの吸着等温線

測定温度：●, 20°C ; ◐, 30°C ; ◑, 35°C ; ◒, 40°C ; ○, 45°C

他の測定条件は図2-7 と同じ。

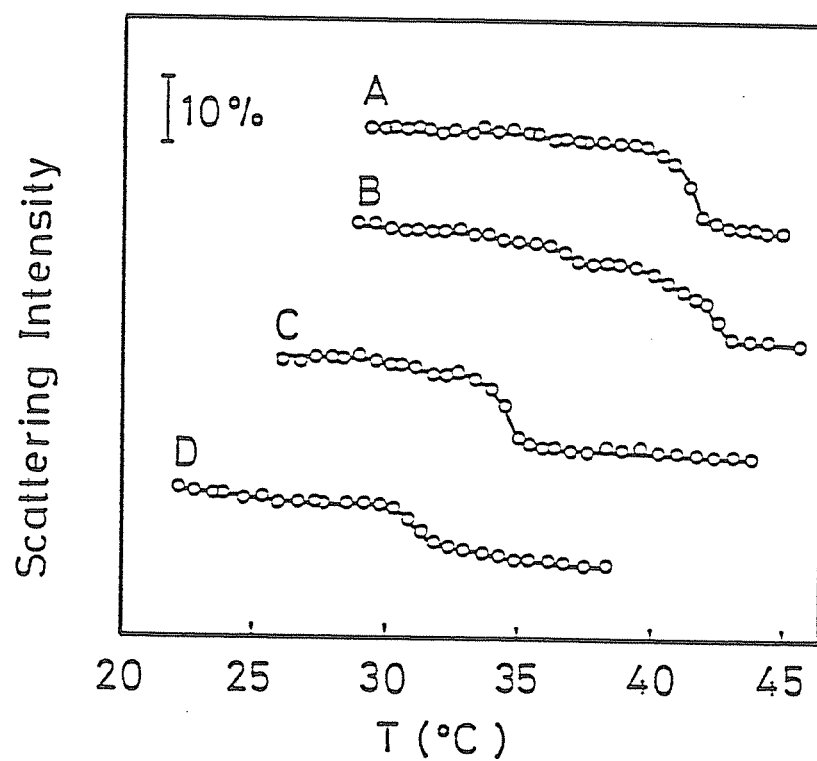


図2-19 DPPCリポソームサスペンションの90°光散乱(450 nm)強度の温度変化。昇温速度(1°C/min)。測定前に脂溶性イオン存在下でインキュベーション(45°C, 10 min)した。リポソーム(1 mg/ml), 脂溶性イオン濃度(0.5 mM)

A; control ; B, TPP⁺ ; C, TPB⁻ ; D, probe III,

表2-6 脂溶性イオン存在下のDPPCリボソームの相転移温度Tc

脂溶性イオン濃度(0.5 mM) , 相転移温度は光散乱測定 (図2-19参照) し、散乱強度変化速度のもっとも大きい温度から求めた。

Lipophilic ions	Tc (°C)
No added	41.4
TPP ⁺	42.0
TPHP ⁺	40.5
Probe III	31.0
TPB ⁻	34.6
SDS	32.2

の炭素鎖をもち、アニオン系の極性基である。SDSでもprobe IIIとほぼ同程度の温度まで低下している。またTPB⁻とTPP⁺を比較すると前者は低下するが後者は低下しない。TPHP⁺もまたほとんど低下しない。脂溶性イオンの吸着量は、probe III ≫ TPB⁻ > TPHP⁺ > TPP⁺であり、吸着量と相転移温度の低下が関連していると考えられる。豊島ら[16]はDPPCリポソームへのTPB⁻の吸着による相転移温度の低下は、脂質極性基の静電場への影響であると報告している。しかしながら、脂溶性カチオン(probe III)と脂溶性アニオン(SDS)の場合、電荷は逆でありながら同程度に相転移温度が低下している。この場合、吸着したプローブの静電場への効果よりも、むしろプローブの脂質アルキル鎖への透入によって、膜脂質分子のモル分率が低下し、凝固点降下に似た現象が起こっているのではないかと考えられる。

2-5 まとめ

リポソームへの脂溶性イオンの吸着現象を解析した。

1. リポソームへの脂溶性イオン吸着はLangmuir型であり、脂溶性の高いプローブほど吸着量は多く、解離定数は小さい。ESRによる吸着量測定から温度変化から吸着に伴う自由エネルギー変化 ΔG を計算した。吸着に伴う ΔH はほぼゼロであり、 ΔG への寄与はない。吸着に伴う ΔG はエントロピー変化 ΔS が支配的であることが示された。すなわち脂溶性イオンのリポソームへの吸着は疎水性効果が大部分を占めることを表す。
2. スピンスピン交換相互作用の測定からスピンプローブのリポソーム内の吸着サイトを明らかにした。その結果、プローブ分子内の P^+ は脂質膜の表面付近に存在することを支持した。
3. DPPCリポソームを用い、脂溶性イオンの吸着量の温度変化を測定した。吸着量は脂質相転移温度付近で著しく変化した。温度上昇に伴う相転移での増加の割合は、脂溶性の高いプローブほど大きいことが明らかとなった。

引用文献

- 1 Denny, D.B. and Smith, L.C. (1962) J. Org. Chem. 27, 3404-3408.
- 2 Kornberg, R.D. and McConnell, H.H. (1971) Biochem. 10, 1111-1120.
- 3 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) Biochim. Biophys. Acta 821, 377-386.
- 4 Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake Y. (1979) J. Membrane Biol. 49, 105-121.
- 5 Kamo, N., Racanelli, T. and Packer, L. (1982) Methods Enzymol. 88, 356-360.
- 6 Cafiso, D.S. and Hubbell, W.L. (1982) Biophys. J. 39, 263-272.
- 7 Dixon, M. (1953) Biochem. J. 55, 170-171.
- 8 Gill, S.J. and Wadso, I. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2955-2958.
- 9 Kauzmann, W. (1959) Advances in Protein Chem. 14, 1-63
- 10 Smith, R. and Tanford, C. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 289-293.
- 11 Tanford, C. (1980) The hydrophobic effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, 2nd ed., Wiley Interscience, N.Y.
- 12 Wishnia, A. (1963) J. Phys. Chem. 67, 2079-2082.
- 13 McConnell, H.M. (1958) J. Chem. Phys. 28, 430-446.
- 14 Pake, G.E. (1962) Paramagnetic Resonance, Chap. 4, W.A. Benjamin Inc.

- 15 Altenbach, C. and Seelig, J. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 818, 410-415.
- 16 Tanaka, J., Akabori, K. and Toyoshima, Y. (1981) *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 74, 287-297.
- 17 Benz, R., Lauger, P. and Janko, K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455, 701-720

第3章 高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオンの吸着および 膜電位推定値の比較

3-1 緒言

バクテリアやオルガネラなどの小胞の膜電位 [1,2] は、それらが微小電極が使用できるほど大きくないので、間接的な方法により推定される。この方法のひとつとして、膜透過性の脂溶性イオンを用い、膜内外の分布状態から推定する方法がある [3-7]。この方法の有用性については、第1章で述べたとおりである。プローブとりこみが平衡状態に達した時、小胞内外のプローブの電気化学ポテンシャルが等しくなるので、膜電位 $\Delta\psi$ は次式で示される。

$$\Delta\psi = (RT/F)\ln(C_o/C_i)$$

ここで C_o, C_i は小胞外部、内部のプローブ濃度である。従って C_o, C_i がわかれば $\Delta\psi$ が推定できる。脂溶性イオン濃度 C_o は直接測定できるが、 C_i はとりこみ量を内部体積で割った値で定義される。しかし実際のとりこみ量は内部ですべて free に存在しているのではなく、膜への吸着量が含まれる。そのため膜電位を正しく測定するには吸着の補正が必要である。

本章では高度好塩菌 Halobacterium halobium 膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着の測定について述べる。脂溶性イオンは TPP⁺ およ

び同族体 $(\text{Phe})_3\text{-P}^+(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$ を使用する。高度好塩菌は光駆動性のイオンポンプを含んでいる。そのため、光照射で内部負の膜電位を発生し、光消去で膜電位が消失でき、また光強度を変化させることで膜電位の大きさが変えられるという特徴がある。

まず膜電位がない状態（暗所下）で、膜ベシクルへの吸着量を測定する。次いで光照射で膜電位を発生し、プローブのとりこみ量から膜電位を推定する。吸着補正のモデルを用い、脂溶性の異なるプローブで同一の値が得られるかどうかを比較検討する。

またプローブとりこみ量およびとりこみ速度への tetraphenylboron (TPB⁻) 添加の効果について考察する。

3-2 実験材料および方法

3-2-1 実験材料

高度好塩菌 *H. halobium* は KH-10 株を使用した。この株はハロロドプシンを含んでおり、バクテリオロドプシンは欠損している。ハロロドプシンは光駆動性のクロライドポンプであり [18-20]、光照射によって内部負の膜電位を発生できる。高度好塩菌の培養および膜ベシクルの調製は常法 [21] に従って行なった。調製したサンプルのベシクル内体積は $3.0 \mu\text{l/mg protein}$ で 90 % 以上が right-side-out vesicle である [18]。タンパク質は牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法 [35] で定量した。ベシクルは測定液と同じ組成の 4 M NaCl、10 mM HEPES /NaOH (pH 7.0) にストックした。プローブ吸着の pH 効果を測定するときは、それぞれの pH に調整した 3.5 M NaCl に分散し、ベシクル内の緩衝液を交換して使用した [21]。pH 5 から 7 では 10 mM MES、7 から 8 では 10 mM Tris-HCl を使用した。

TPP⁺, TPMP⁺, TPEP⁺, TPPP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺, TPHP⁺ の脂溶性イオンをプローブとして使用した。

3-2-2 測定方法

プローブのベシクルへのとりこみは脂溶性イオン選択性電極で測定した [36]。電極の作製法および測定法は、2-3-1 に示した方法と同じである。参照電極と連結した塩橋は、2% 寒天を含む測定液と同じ塩組成の溶液で作製した。

ベシクルに膜電位を発生するための光は 1 kW プロジェクターランプ光を cut-off filter (500 nm 以上) をとおして照射した。

1 mM octylglucosideをベシクル溶液に添加し膜をleakyにする
と、光を照射しても電極電位が変化しなかった。これにより電極電
位を観測するうえで光照射による妨害がないことを確認した。光強
度は neutral density filterで変化させ、radiometer(Model A26,
YSI-Kettering)で測定した。

光誘起性膜電位は、プローブ初濃度10 μ M で測定した。図3-1
にベシクルを測定液に添加してからの電極電位の経時変化の一例を
示す。ストックベシクルをプローブ濃度10 μ M の測定液に添加
(暗所下)すると、電極電位が減少する。図3-1 は電極電位の減少
方向を上向で表わした。電極電位変化の平衡値と2-1 式から膜電位
がないときの吸着量 $U_b(0)$ が計算できる。ここで (0)は膜電位ゼロ、
 $\Delta\psi=0$ を表わす。(この値はプローブ濃度が吸着平衡で内外同じと
きの U_b と等しい)。光を照射すると内部が負の光誘起膜電位が発生
しベシクル内へのプローブとりこみが起こるため、電極電位が減少
する。とりこみは数分で平衡する。この平衡値から膜電位によって
ベシクル内へとりこまれた量が計算できる。

脂溶性イオン選択性電極でベシクル外液のプローブ濃度変化を連
続的にモニタできる。電極の応答時間はプローブ濃度の2倍変化で
4-7秒であった。電極電位の経時変化を測定し、プローブのとりこ
み速度を解析した。速度定数, k はつぎの 1次反応速度式で計算し
た。

$$U(t) = U_e [1 - \exp(-k^{on}t)] \quad (\text{on kinetics}) \quad (3-1)$$

$$U(t) = U_e \exp(-k^{off}t) \quad (\text{off kinetics}) \quad (3-2)$$

ここで $U(t)$ は光を照射(on)してからまたは消去(off) してから
のとりこみ量の経時変化、 U_e は光照射でのとりこみ量の平衡値である
(付録-D に解析プログラムを示した)。

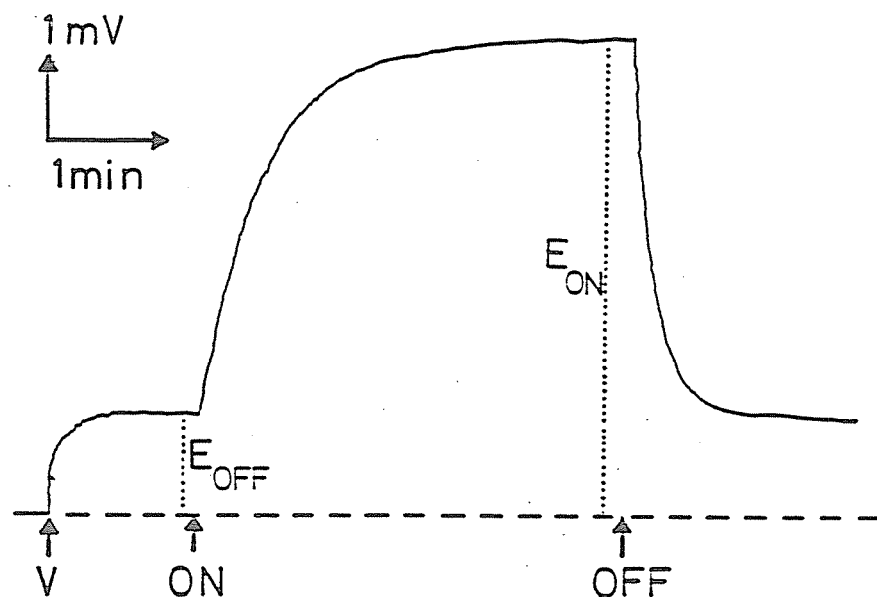


図3-1 高度好塩菌膜ベシクル添加による電極電位 E の経時変化

暗所下（膜電位なし）でベシクルを測定液に添加すると、外液のプロープ濃度が減少する（上方向への変化）。この変化は膜へのプロープ吸着による。光照射でベシクル内負の膜電位が発生するため、プロープはさらに内部へ取り込まれ、外液の濃度減少が起こる。光消去で膜電位はなくなり、プロープは外液に排出される。この平衡値は光照射前と同じである。 E_{on} , E_{off} からそれぞれ膜電位がないときの吸着量 $U_b(0)$ と膜電位 $\Delta\psi$ が計算できる[36]。

3-3 結果と考察

3-3-1 高度好塩菌膜ベシクルへのプローブ吸着

図3-2 は種々のプローブの吸着量を吸着平衡でのfreeのプローブ濃度に対してプロットした吸着等温線である。吸着量を同じ濃度で比較すると、 $(\text{Phe})_3\text{-P}^+(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$ の炭素鎖が長いプローブほど吸着量は増加する。またプローブ濃度が高くなると吸着は飽和する傾向であることがわかる。この吸着変化は第2章であつかったリボソームの場合とほぼ同様であり、Langmuir型の吸着式(2-4式)に従うと考えられる。Langmuir型吸着式はまた2-5 式のDixon plotで示すことができる。図3-3AはTPP⁺, TPEP⁺, TPMP⁺についてプロットした。いずれも直線性は良好である。最小二乗法で求めた決定係数は0.995 またはそれ以上であった。TPBP⁺, TPAP⁺, TPHP⁺ のように比較的炭素鎖の長いプローブではふたつの吸着サイト（高親和性、低親和性）があることを示している（図3-3B）。2 直線の交点でのプローブ濃度を C_t とする。表3-1 にLangmuir吸着定数を各プローブについて求めた結果をまとめた。解離定数 K は炭素鎖の長い（脂溶性の高い）プローブほど低下している。この傾向もリボソームの場合と同様である。図3-4 はpHを変えたベシクルについてプローブの吸着量を測定した結果である。吸着量は測定液のpHに対して不変である。高塩濃度（4 M、3.5 M NaCl）では吸着の静電的な効果がシールドされているためであると考えられる。

ベシクルに光照射するとハロロドプシンによるクロライドイオン輸送がおこり、ベシクル内負の膜電位が発生する。膜電位に従ってプロトンは電気泳動的にベシクル内へ取り込まれる。しかしベシク

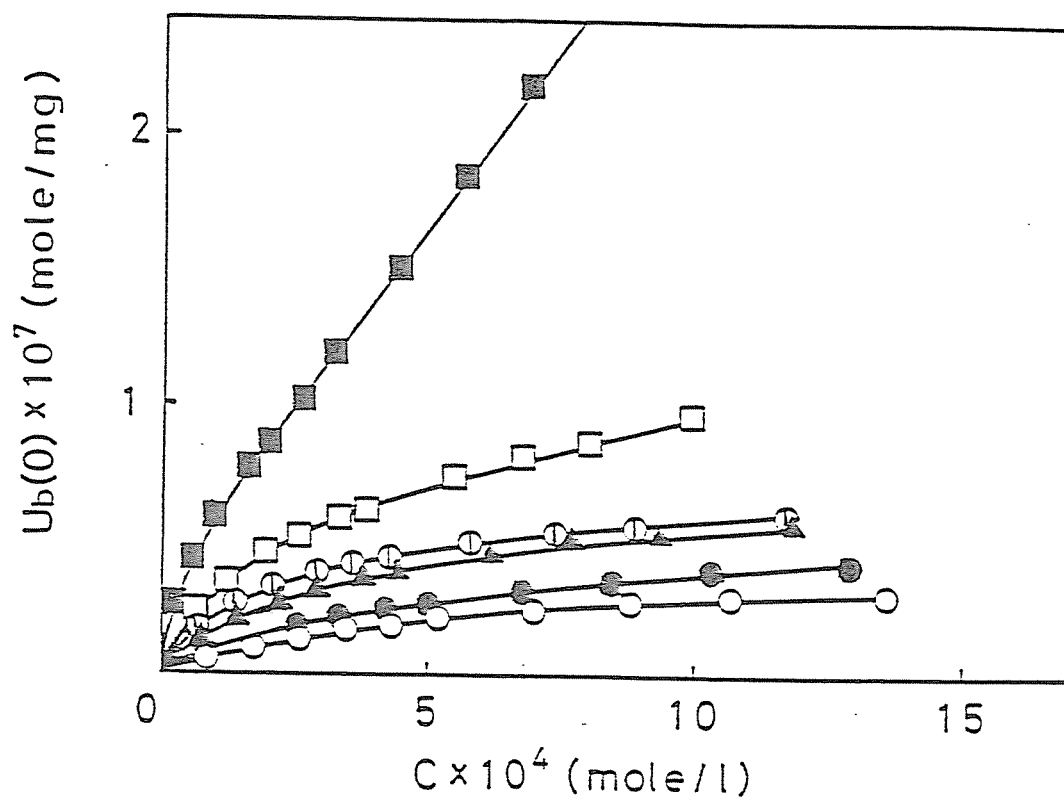


図3-2 高度好塩菌膜ベシクルへの種々の脂溶性イオンの吸着等温線
縦軸は膜電位がないときの吸着量 $U_b(0)$,横軸は吸着平衡での外液に
freeに存在するプローブ濃度 C 。測定温度; 30°C 。

○,TPMP⁺ ; ●,TPEP⁺ ; ▲,TPBP⁺ ; ⊙,TPP⁺ ; □,TPAP⁺ ; ■,TPHP⁺ .

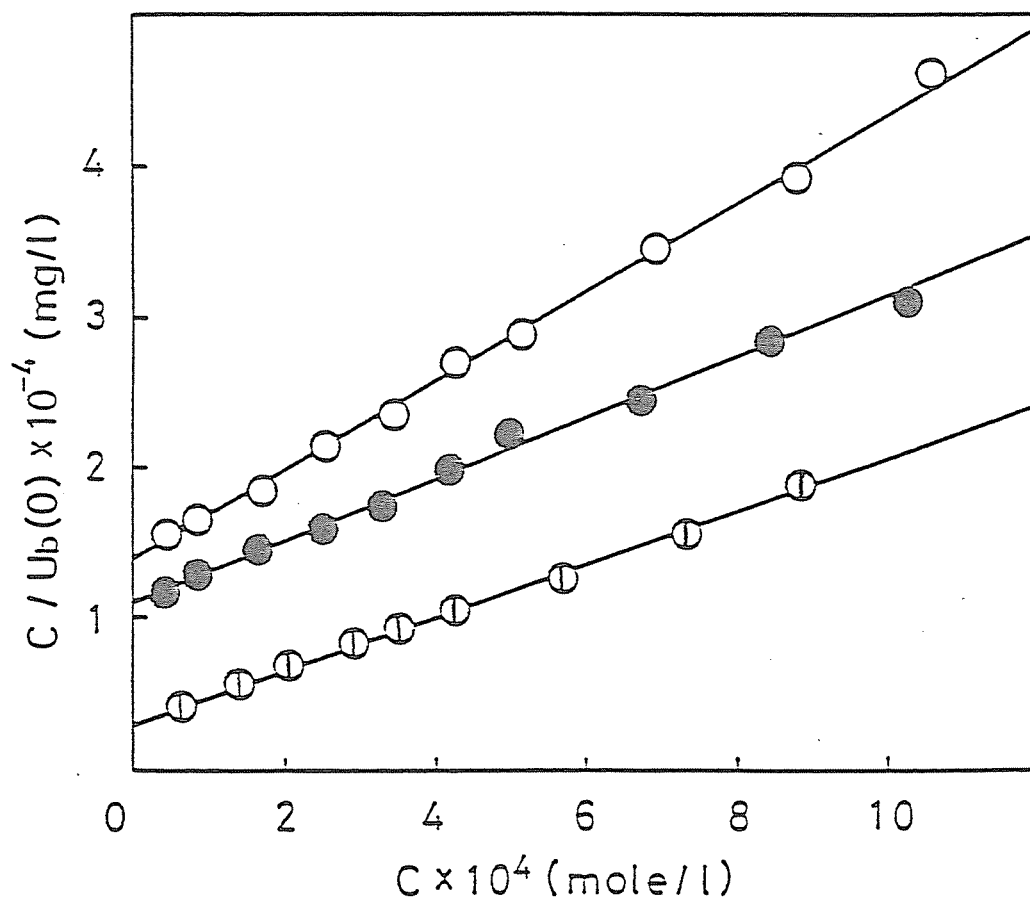


図3-3 A 2-5 式(Dixon plot)にしたがった吸着量の解析

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; ⊙, TPP⁺

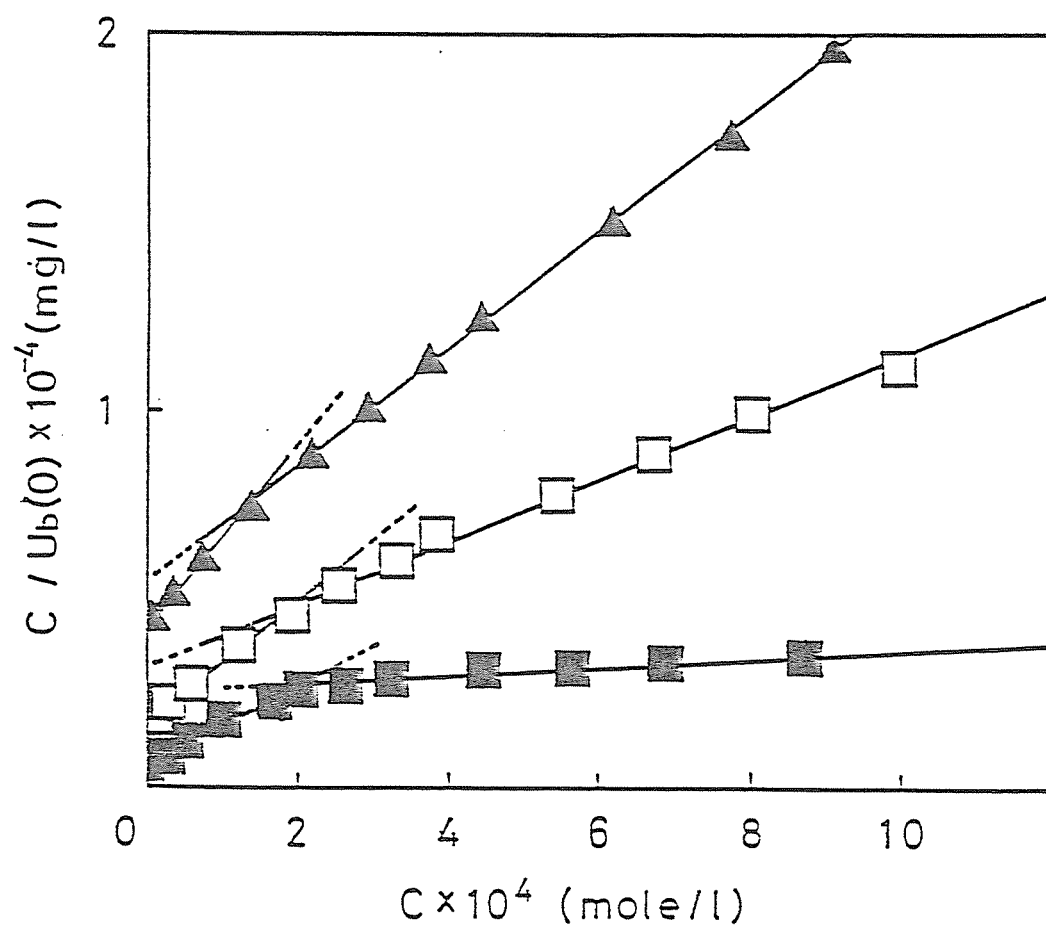


図3-3 B 2-5 式(Dixon plot)にしたがった吸着量の解析

▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ■, TPHP⁺ .

表3-1 脂溶性イオンの高度好塩菌膜への吸着定数

KH-10 株を使用した。測定液：4 M NaCl, 10 mM HEPES/NaOH(pH 7.0)

測定温度：30°C, K, A 値は2-5 式で決定した。

Probe	K (mol/l)		A (mol/mg)	
	High	Low	High	Low
TPP ⁺	$1.95 \cdot 10^{-4}$		$6.08 \cdot 10^{-8}$	
TPMP ⁺	$4.48 \cdot 10^{-4}$		$3.38 \cdot 10^{-8}$	
TPEP ⁺	$5.40 \cdot 10^{-4}$		$4.92 \cdot 10^{-8}$	
TPBP ⁺	$1.61 \cdot 10^{-4}$	$3.43 \cdot 10^{-4}$	$3.89 \cdot 10^{-8}$	$6.45 \cdot 10^{-8}$
TPAP ⁺	$1.01 \cdot 10^{-4}$	$4.51 \cdot 10^{-4}$	$5.99 \cdot 10^{-8}$	$1.29 \cdot 10^{-7}$
TPHP ⁺	$4.72 \cdot 10^{-5}$	$4.29 \cdot 10^{-4}$	$8.26 \cdot 10^{-8}$	$1.57 \cdot 10^{-6}$

High = High affinity site.

Low = Low affinity site.

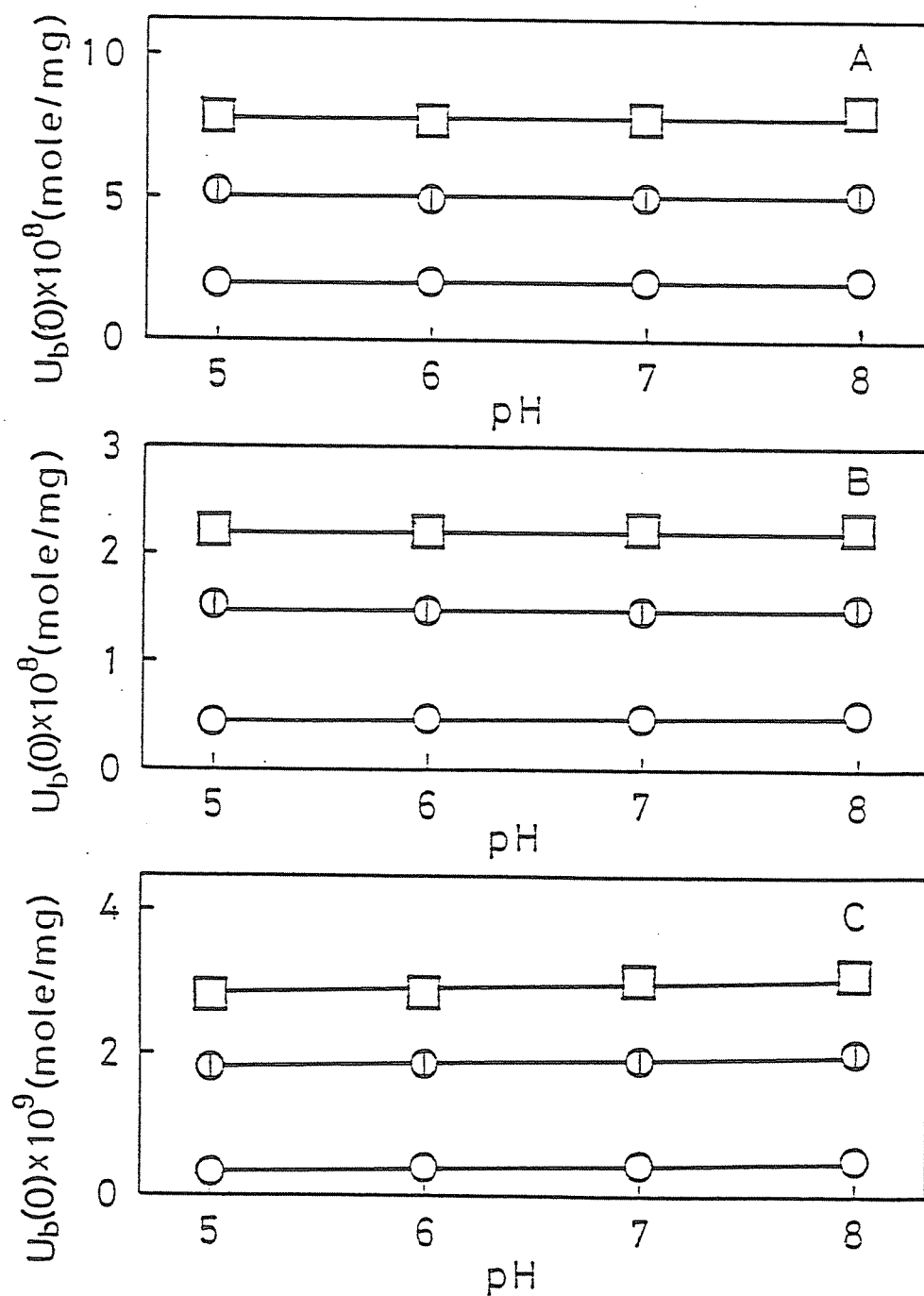


図3-4 脂溶性イオン吸着のpH依存性。A,B,C はそれぞれプローブ初濃度が1 mM, 100 μ M, 10 μ M のときの吸着量である。

○,TPMP⁺ ; ⊙,TPP⁺ ; □,TPAP⁺

ル内外はプロトンの緩衝能があるため pH は変わらない。仮に pH が変わっても、図 3-4 に示したように吸着は変わらないので、吸着定数の pH 依存性は考慮しなくてよい。

3-3-2 膜電位推定とプローブ吸着モデルの比較

膜電位に依存しない吸着モデル (A)

光を照射するとベシクル内負の膜電位が発生し、プローブはベシクル内へ取り込まれる。これまで、膜電位がないときの吸着について明らかにしたが、膜電位によって内部にプローブが蓄積されても吸着量が膜電位がないときと変わらないと仮定すると、膜電位が計算できる。図 3-5 はこの仮定で推定した膜電位を各プローブの吸着量 $U_b(0)$ にたいしてプロットした。このモデルは吸着補正としてよく使用される [9, 15, 16, 26-28]。 $U_b(0)$ の測定は 3-2-2 の方法で行なった。膜電位の推定は光強度を変えて実験した。吸着量の見積りが正しければ、同一条件で求めた膜電位はどのプローブでも同じになるはずである。しかし推定値は用いたプローブによって異なっている。光強度が 1120 W/m^2 の場合について比較すると、最大値は TPP^+ で -148 mV 、最小値は TPMP^+ で -129 mV である。 $U_b(0)$ は TPMP^+ より TPP^+ の方が大きいことから、 $U_b(0)$ の大きいプローブほど膜電位は大きめに見積られていることを表わしている。膜電位によって内部に蓄積されたときの吸着は $U_b(0)$ の大きいプローブほど吸着しやすいということから（プローブ濃度 $10 \text{ } \mu\text{M}$ では図 3-2 からわかるように吸着は飽和していない）、膜電位によって引き起こされたプローブの内部蓄積による吸着量の変化を考える必要がある。

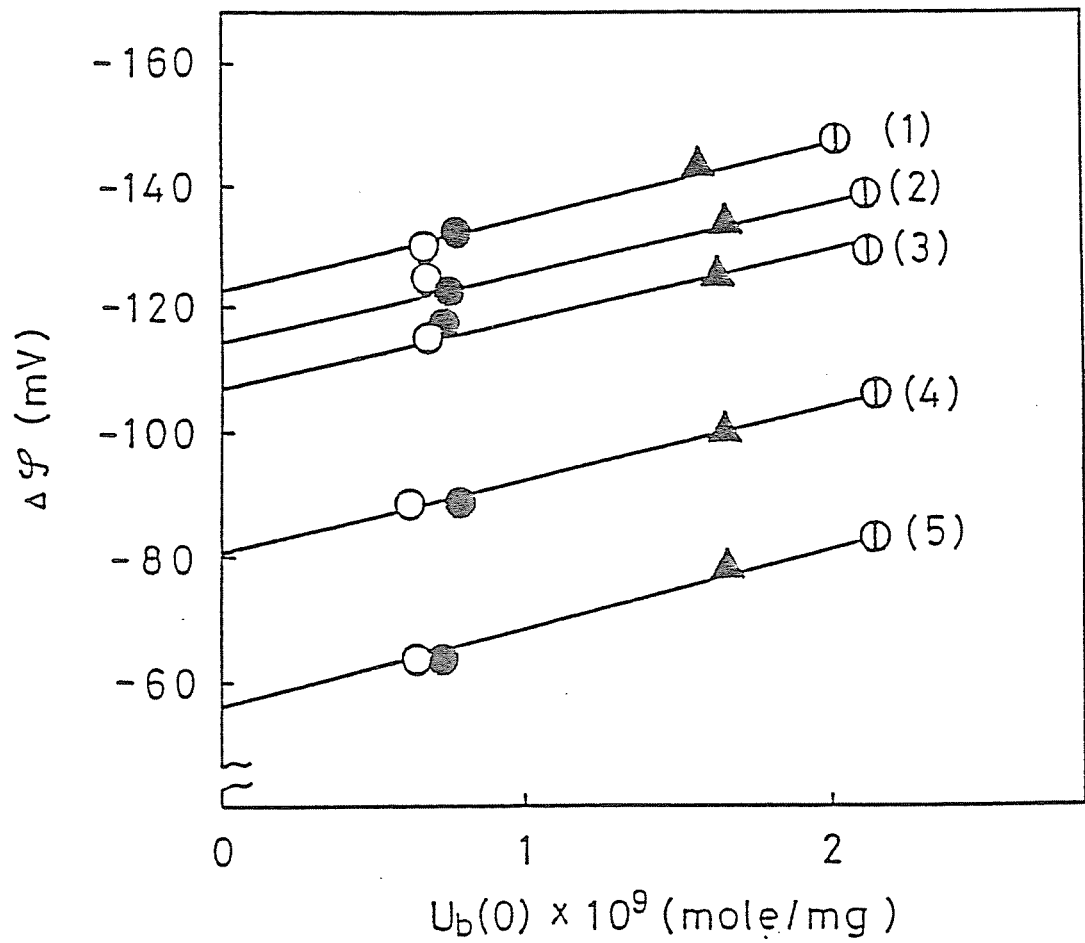


図3-5 膜電位に依存しない吸着モデル (A) で推定した膜電位
 横軸は膜電位がないときの吸着量 $U_b(0)$ である。プローブ初濃度は
 $10 \mu M$ 。光強度：(1)1120, (2)720, (3)465, (4)200, (5)82 W/m^2
 ○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; ⊙, TPP⁺

ベシクル内部への吸着モデル (B)

-120 mVの膜電位（内部負）があるとき、カチオン性プローブはベシクル内で外液の 100倍に濃縮されている。従って膜電位が大きいとき、ベシクルの吸着はほとんど内側のプローブ濃度 C_i で表わされることができる。そこで膜電位 $\Delta\psi$ があるときの吸着量 $U_b(\Delta\psi)$ を次式で表わす。

$$U_b(\Delta\psi) = (1/2)AC_i / (K + C_i) \quad (3-3)$$

ここで(1/2) はベシクル膜が内外対称であると仮定し、ベシクル内の吸着サイトが表3-1 で示した最大吸着量 A の1/2 であるとした。しかしこのモデルでは膜電位がわからないと C_i はわからないので、 $U_b(\Delta\psi)$ を解析的に求めることは不可能である。そこでコンピュータを使い、反復法で膜電位と C_i を計算した。図3-6 に計算のアルゴリズムを示す。最初に初期値 $C_i(\text{test})$ を決める。この値は吸着量をゼロと仮定し、とりこみ量と内部体積から決める。次に $C_i(\text{test})$ を使って3-3式で $U_b(\Delta\psi)$ を計算する（吸着定数は表3-1 を使用、吸着定数が C_t で変わる場合は $C_i(\text{test})$ にあわせて変えた）。全プローブ量から仮の吸着量 $U_b(\Delta\psi)$ を引き、内部濃度の推定値 $C_i(\text{estimated})$ を計算する。 $C_i(\text{estimated})$ と $C_i(\text{test})$ が等しくなれば、初期値を変えて再び計算する。これらの C_i の誤差が 0.1 %以内になるまで反復計算し、 C_i 、 $U_b(\Delta\psi)$ を決めた。

C_i, C_o から計算した膜電位を $U_b(\Delta\psi)$ に対してプロットした結果を図3-7 に示す。膜電位は用いたプローブによって異なっている。プローブ間のプロットは直線的であり、勾配はモデルAとは逆で、

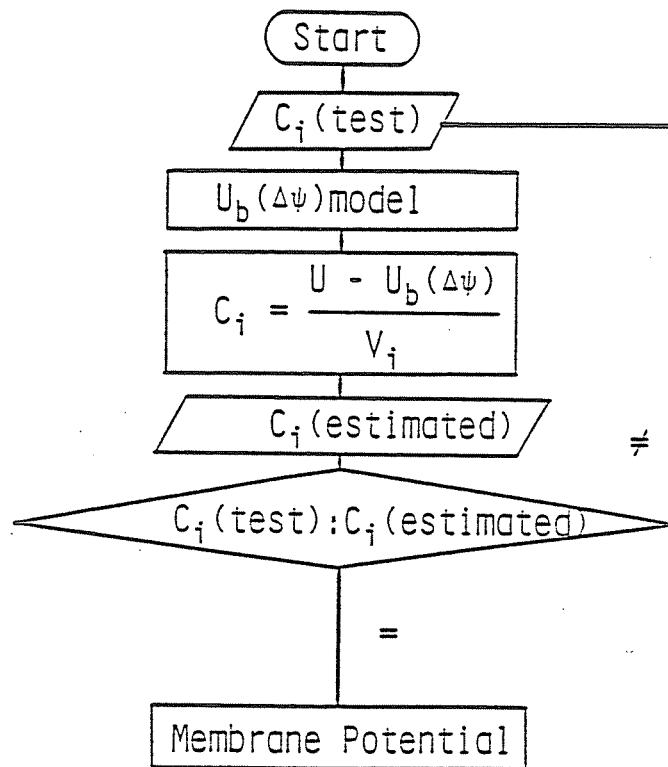


図3-6 吸着量 $U_b(\Delta\psi)$ ，膜電位 $\Delta\psi$ を推定するための計算アルゴリズム（本文参照、付録-Cにプログラムを示す）。

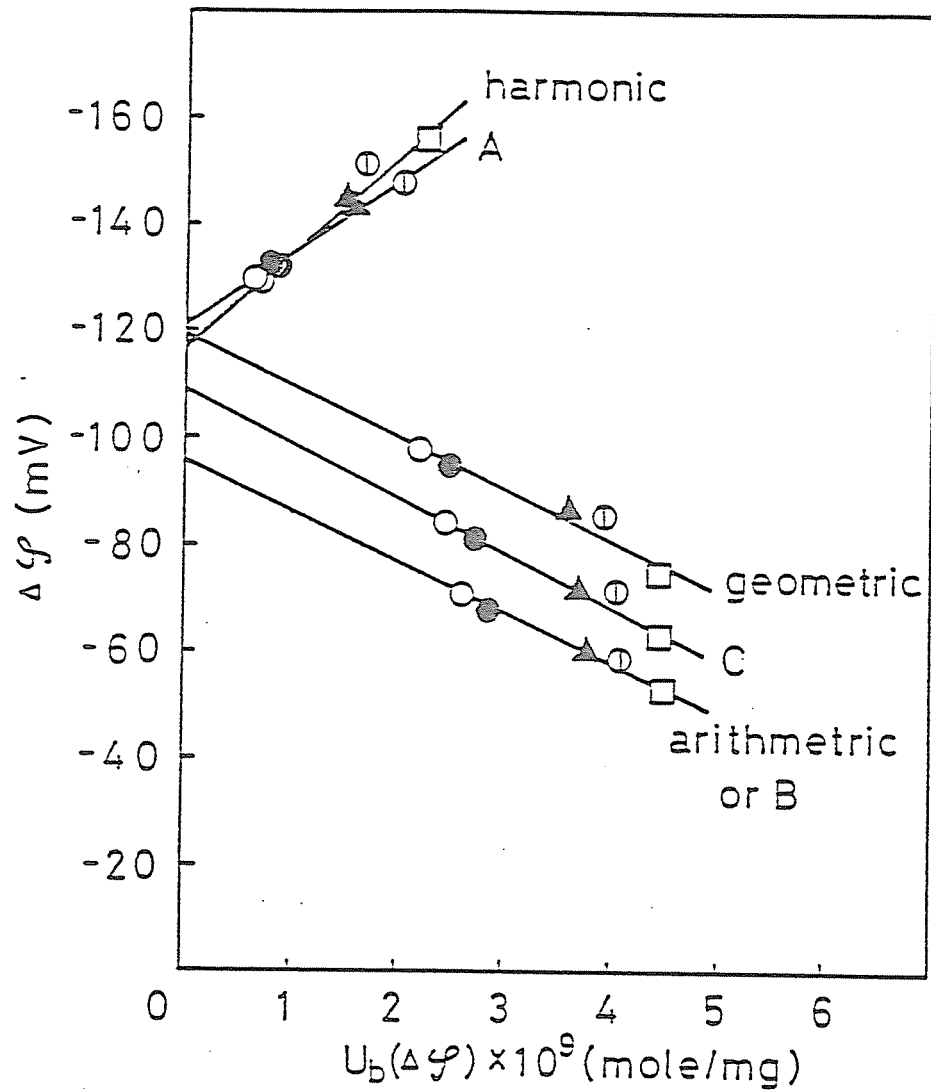


図3-7 各種吸着モデルで吸着量を補正して推定した膜電位

A: 膜電位に依存しない吸着モデル、B: ベシクル内部への吸着モデル

C: 指数平均モデル、 C_i と C_o の平均濃度（算術、幾何、調和）。横軸

はそれぞれのモデルで推定した吸着量 $U_b(\Delta\psi)$ 、ただしモデル A

は $U_b(0)$ でプロットした。光強度: 1120 W/m^2 。

○, TPMP⁺; ●, TPEP⁺; ▲, TPBP⁺; ⊙, TPP⁺; □, TPAP⁺。

$U_b(\Delta\psi)$ の多いプローブほど膜電位が小さい。この原因は吸着量の見積りが多すぎるためである（くわしくは以下に述べる）。

C_i と C_o の平均値を用いた吸着モデル

次に吸着が C_i と C_o の両方に依存して起こる場合[29,30]を考える。ここで吸着は C_i と C_o のある平均濃度に従って起こると仮定する。以下の平均濃度をあてはめた。

$$\text{算術平均: } C_m = (C_i + C_o)/2$$

$$\text{幾何平均: } C_m = (C_i C_o)^{1/2}$$

$$\text{調和平均: } C_m = 2C_i C_o / (C_i + C_o)$$

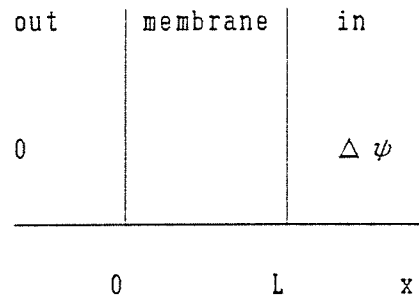
$$U_b(\Delta\psi) = AC_m / (K + C_m)$$

幾何平均は均一なイオン交換膜の膜現象を解析するためによく用いられる。反復法で $U_b(\Delta\psi)$ を求め、膜電位を推定した。結果を図3-7に示す。どの平均の場合もプローブによって膜電位は異なる。調和平均は脂溶性の高いプローブほど推定値は大きくなる。一方、他の平均では逆に変化する。

指数平均モデル (C)

Zaritsky[9]らは膜内のプローブ量を表わすモデルを提出しており、'exponential mean model'と呼んだ（この平均はSchlögl[31]によって元来詳しく取り扱われていたものである）。このモデルは次の仮定が用いられる。（1）膜は均一である、（2）膜内の電位勾配は定電場である、（3）膜内の厚み方向の位置 x における吸着量は

$C_0 \exp[-F\psi(x)/RT]$ に比例する。ここで $\psi(x)$ は x における電位である。高度好塩菌の場合、図3-2、表3-1 にみられるように飽和吸着がおこるので仮定(3) はあてはまらない。この仮定は x での吸着量がLangmuir型であるとして次のように変えられる。



膜電位 $\Delta\psi$ の膜内 x における電位 $\psi(x)$ は定電場の仮定より

$\psi(x) = \Delta\psi x/L$ 、 L は膜の厚さである。 x での吸着量 $U_b(x)$ は

$$U_b(x) = (A/L)C(x)/(K + C(x)) \quad (3-4)$$

ただし $C(x) = C_0 \exp[-F\Delta\psi x/LRT]$ である。膜内の全吸着量は膜の厚さ L にわたっての積分として求められる。

$$U_b(\Delta\psi) = A \ln[(K+C_i)/(K+C_o)]/\ln[C_i/C_o] \quad (3-5)$$

このモデルを用いて反復法（モデルB参照）で $U_b(\Delta\psi)$ と $\Delta\psi$ を計算した。結果を図3-7 に示す。プローブによって $\Delta\psi$ が違う。このモデルでは吸着量の見積りが多すぎることを表わす。

‘吸着しない状態’への外挿法 [36,37]

図3-7 にみられるように同一の光強度で測定しても、プローブに

よって $\Delta\psi$ が異なるが、プロットが直線で示されることがわかる。さらにいえることはどのモデルでも縦軸への外挿値がほぼ等しいことである（ただし算術平均濃度とモデルBの場合はずれる）。同じ結果は他の光強度でも得られることがわかった。外挿で求められる値は吸着が起こらないような‘仮想的’なプローブで推定した膜電位であると考えることができる。ベシクルへの吸着がないのならば、とりこみ量がすべて内部でfreeに存在するので、吸着補正しなくても膜電位が決まる。図3-7のように $U_b(\Delta\psi)=0$ へ外挿した値が仮想的なプローブで推定した膜電位であると考えられる。どのモデルでも縦軸への外挿値がほぼ等しいことは、実際の膜電位と外挿値が非常に近いことを示唆している。簡易な方法としては、 $U_b(0)$ を用いるモデルAで外挿する方法がよい。またこの外挿は生菌でも同様に取り扱うことができる。

図3-5 からわかるようにTPP⁺でもとめた膜電位よりもTPMP⁺の方が外挿値により近い。しかしながらプローブの透過速度はTPMP⁺の方が多少遅い。TPMP⁺の透過はtetraphenylboron(TPB⁻)の添加で速められることがよく知られている[3,4]。以下にプローブとりこみ速度と膜電位へのTPB⁻の効果について考察する。

3-3-3 プローブ吸着およびとりこみへのTPB⁻の効果

TPB⁻を高度好塩菌膜ベシクルに添加したときのプローブの吸着量を測定した（図3-8）。プローブに対するモル比でTPB⁻を10%まで添加しても $U_b(0)$ は変化しない。またBakker[11]は同様に大腸菌へのTPMP⁺の吸着量はTPB⁻存在下でも変わらないことを示している。

表3-2 は吸着が膜電位に依存しないモデル（A）を用いてTPB⁻存

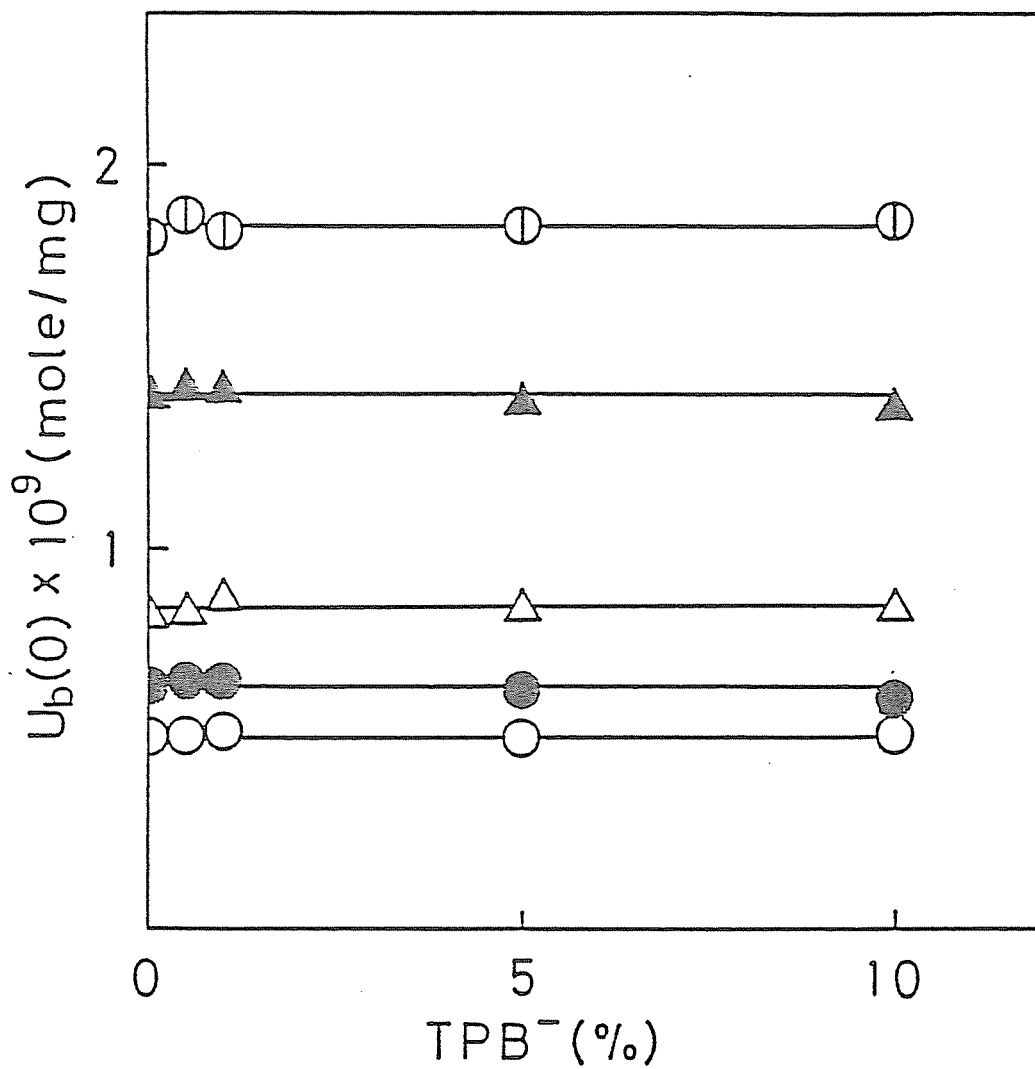


図3-8 TPB⁻ を添加したときのプローブの吸着量 $U_b(0)$. プローブ初濃度は10 μ M . ベシクル(1.8 mg protein/ml). 測定温度 : 30°C
10% TPB⁻は 1 μ M にあたる。

○,TPMP⁺ ; ●,TPEP⁺ ; △,TPPP⁺ ; ▲,TPBP⁺ ; ①,TPP⁺

表3-2 膜電位に依存した脂溶性イオンとりこみへのTPB⁻の効果

KH-10 ベシクル(1mg protein/ml)は4M NaCl, 10mM HEPES/NaOH (pH 7.0)の測定液に分散した。測定温度: 30 °C, プローブ初濃度は 10 μ M 光照射(500 nm以上、1120 W/m²) でベシクル内負の膜電位が発生し、プローブがとりこまれる。膜電位は吸着モデル A (吸着が膜電位に依存しない) で推定した。

Membrane potential estimated with Model A(mV)					
TPB ⁻ (mol ratio,%)					
	TPMP ⁺	TPEP ⁺	TPPP ⁺	TPBP ⁺	TPP ⁺
0	-122.6	-126.6	-128.6	-139.8	-144.1
0.5	-125.9	-128.2	-128.5	-140.4	-144.5
1.0	-125.7	-129.2	-130.9	-139.7	-145.1
5.0	-120.3	-125.1	-131.4	-138.1	-144.7
10.0	-121.0	-125.5	-130.7	-137.9	-145.4

在下で膜電位を計算した結果である。ホスフォニウムプローブを使用する限りではベシクルへのとりこみ量にTPB⁻添加の妨害は認められない。この結果は膜電位推定値がTPB⁻添加で変化しないことを意味する。表3-2 は光強度1120 W/m² のデータであるが、光強度を変えても同様な結果であった。

3-3-4 とりこみ速度へのTPB⁻の効果

プローブとりこみの速度定数はTPB⁻存在下で変化する。表3-3 は各プローブの光onとoff 状態でのそれぞれの速度定数 k^{on} , k^{off} へのTPB⁻の効果を示した。TPMP⁺ の場合、TPB⁻を0.2 μ M (TPMP⁺ の 2 %) 存在下で、 k^{on} はTPB⁻ の存在しない場合に比べて約 3倍大きくなる。またここで使用したプローブのなかでTPMP⁺ が最もTPB⁻による効果が大きく、速度定数増加の割合が多い。一方TPP⁺はほとんど影響を受けない。 k^{off} に関してもこの傾向は同じである(表3-3 参照)

透過係数はふたつの因子、膜相への分配係数と膜内の移動度によって決まる[32]。TPB⁻が存在しない場合の速度定数(表3-3、TPB⁻が 0% の場合)は脂溶性の高いプローブほど大きい。この変化は吸着定数(表3-1) K の変化と対応している。つまり k 値は吸着しやすいプローブほど小さい傾向である。従ってプローブ間の速度定数の違いは分配係数の違いによるものであると考えられる。図3-8の結果からわかるように、TPB⁻添加によってプローブ吸着量には影響しない(これは分配係数は変らないことを示す)。一方、透過速度定数はTPB⁻添加で大きくなることから、膜内のプローブ移動度が増加していると考えられる。従ってTPB⁻の作用は吸着量を変えるよう

な表面電位あるいは膜内電位分布[34]を変化するように働くのではなく、プローブのキャリアー[33]として働くものと考えられる。比較的とりこみが速い TPP^+ と TPBP^+ がなぜ TPB^- の効果が少ないのか、まだ明らかではない。いまのところ考えられることとして、膜内の脂溶性部位におけるキャリアー(TPB^-)とプローブの会合性が脂溶性の高いプローブほど低いことがあげられる。

表3-3 プローブとりこみ速度定数、ON-KINETIC(k^{on}),OFF-KINETIC(k^{off})へのTPB-の効果．実験条件は表3-2 と同じである．速度定数は3-1,3-2 式で計算した．ndは測定値がないことを表す。

k^{on} (s^{-1})	TPB-(mol%)	TPMP+	TPEP+	TPPP+	TPBP+	TPP+
	0	0.022	0.045	0.074	0.131	0.16
	0.1	0.031	nd	nd	nd	nd
	0.5	0.059	0.053	0.081	0.14	0.16
	1.0	0.065	0.079	0.10	0.14	0.17
	2.0	0.075	nd	nd	nd	nd
	5.0	0.066	0.091	0.10	0.14	0.15
	10.0	0.073	0.11	0.13	0.15	0.15
k^{off} (s^{-1})	TPB-(mol%)	TPMP+	TPEP+	TPPP+	TPBP+	TPP+
	0	0.040	0.079	0.13	0.17	0.16
	0.1	0.06	nd	nd	nd	nd
	0.5	0.14	0.098	0.16	0.19	0.16
	1.0	0.14	0.20	0.21	0.20	0.17
	2.0	0.20	nd	nd	nd	nd
	5.0	0.23	0.27	0.23	0.22	0.16
	10.0	0.25	0.31	0.30	0.24	0.16

3-4 まとめ

高度好塩菌 Halobacterium halobium 膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着を測定した。脂溶性イオンは同族体 $(\text{Phe})_3\text{-P}^+(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$ と TPP^+ を使用した。

膜電位がない状態で膜への吸着量を測定した。 $n=0, n=1, \text{TPP}^+$ についてはLangmuir型吸着を示す。他のプローブでは高親和性と低親和性の吸着サイトの存在を示唆した。

光照射でベシクル内負の膜電位が発生し、プローブがとりこまれる。膜電位推定のための各種吸着補正モデルを比較した。

膜電位に依存しない吸着モデルでは脂溶性の高いプローブほど大きな膜電位を与える。ベシクル内部への吸着モデル、 C_i, C_o の平均濃度に依存する吸着モデル、指数平均モデル、これらのモデルではいずれも用いたプローブに依存しない同一の膜電位は得られなかった。

膜電位を推定するための実験法を提出した。各プローブで推定した膜電位をそれぞれの吸着量でプロットする。縦軸へ外挿は 'プローブの吸着しない状態' への外挿である。この値が実際の膜電位により近い値であると考えられる。

膜電位推定およびプローブ透過速度への TPB^- の効果について測定した。 TPB^- の添加はプローブ吸着量には影響せず、透過速度を促進するキャリアーとしての効果があることが明らかとなった。

引用文献

- 1 Felle, H., Porter, J. S., Slayman, C. L. and Kaback, H. R. (1980) Biochem. 19, 3585-3590.
- 2 Mitchell, P. (1979) Eur. J. Biochem. 95, 1-20.
- 3 Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kadziauskas, Tu. P., Liberman, E. A., Skukachev, V. P., Topali, V. P., Tsofina, L. M. and Vlasimirova, M. A. (1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 1-12.
- 4 Harold, F. M. and Papineau, D. (1972) J. Membrane Biol. 8, 27-44.
- 5 Ramos, S., Schuldiner, S. and Kaback, H. R. (1979) Methods Enzymol. 55, 680-688.
- 6 Heinz, E., Geck, P. and Pietrzyk, C. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci. 264, 428-441.
- 7 Rottenberg, H. (1979) Methods Enzymol. 55, 547-569.
- 8 Vacada, V., Kotyk, A. and Sigler, K. (1981) Biochim. Biophys. Acta 643, 265-268.
- 9 Zaritsky, A., Kihara, M. and Macnab, R. M. (1981) J. Membrane Biol. 63, 215-231.
- 10 Casadio, R., Venturoli, G. and Melandri, B. A. (1981) Photobiochem. Photobiophys. 2, 245-253.
- 11 Bakker, E. P. (1982) Biochim. Biophys. Acta 681, 474-483.
- 12 Kuroki, M., Kamo, N., Kobatake, Y., Okimasu, E. and Utsumi, K. (1982) Biochim. Biophys. Acta 693, 326-334.

- 13 Guffanti, A.A., Blumenfeld, H. and Krulwich, T.A. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 8416-8421.
- 14 Bakker, E.P. and Harold, F.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 433-440.
- 15 Ghazi, A., Schechter, E., Letellier, L. and Labedan, B. (1981)
FEBS Lett. 125, 197-200.
- 16 Ahmed, S. and Booth, I.R. (1981) Biochem. J. 200, 573-581.
- 17 Stoeckenius, W. and Bogomolni, R.A. (1982) Annu. Rev. Biochem. 52, 587-616.
- 18 Hazemoto, N., Kamo, N., Tsuda, M., Kobatake, Y. and Terayama, Y. (1984) Biophys. J. 45, 1073-1077.
- 19 Mukohata, Y. and Kaji, Y. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 206, 72-76.
- 20 Schobert, B. and Lanyi, J.K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10306-10313.
- 21 Lanyi, J.K. and MacDonald, R.E. (1979) Methods Enzymol. 56, 398-407.
- 22 Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y. (1979)
J. Membrane Biol. 49, 105-121.
- 23 Kamo, N., Racanelli, T. and Packer, L. (1982) Methods Enzymol. 88, 356-360.
- 24 Muratugu, M., Kamo, N., Kobatake, Y. and Kimura, K. (1979)
Bioelectrochem. Bioenerg. 6, 477-491.
- 25 Dixon, M. (1953) Biochem. J. 55, 170-171.
- 26 Booth, I.R., Mitchell, W.J. and Hamilton, W.A. (1979) Biochem.

- J. 182,687-696.
- 27 Kashket, E. (1981) J. Bacteriol. 146, 377-384.
- 28 Muratsugu, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1982)
Bioelectrochem. Bioenerg. 9, 325-331.
- 29 Lolckema, J. S., Hellingwerf, K. J. and Konnings, W. N. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 681, 85-94.
- 30 Lolckema, J. S., Abbing, A., Hellingwerf, K. J. and Konnings, W. N.
(1983) Eur. J. Biochem. 130, 287-292.
- 31 Schlögl, R. (1964) Fortschr. Physik. Chem., Band 9.
- 32 Johnson, F. M., Eyring, H. and Polissar, M. J. (1954) Kinetics
Basis of Molecular Biology, p. 545, John Wiley and Sons,
New York.
- 33 Stark, F. (1980) Biochim. Biophys. Acta 600, 233-237.
- 34 Andersen, O., S., Feldberg, S., Nakadomari, H., Levy, S. and
McLaughlin, S. (1978) Biophys. J. 21, 35-70.
- 35 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.
(1953) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 36 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) Biochim. Biophys.
Acta 812, 377-386
- 37 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y., J. Membrane Science
in press.

第4章 高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着を補正した膜電位測定

4-1 緒言

小胞の膜電位は、微小電極で直接測定するには小さすぎるため、膜電位プローブで間接的に推定される。プローブのひとつとして膜透過性の脂溶性イオンが使用される[1-5]。第1章に述べたように、この測定原理は明確であるため、すでに膜電位推定の報告[7-11]がなされている。しかしながら、プローブ吸着による膜電位の過大評価の問題点を考慮しないものが多い。第3章では、高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオンとりこみを測定した。同一条件で膜電位を発生させたとき、膜電位が存在していても吸着量が変わらないと仮定すると、脂溶性の高いイオンほど推定した膜電位が大きめに見積られることを示した。これらの結果より、実際の膜電位を推定する実験法を提出した。各プローブでの膜電位を吸着係数または膜電位がないときの吸着量でプロットすると、縦軸への外挿値は吸着しない状態の膜電位であり、実際の膜電位を表すと考えられる。

本章では、この外挿法を理論的に解析し、膜電位に依存した吸着機構について議論する。膜電位依存性の吸着式からプローブ吸着を補正した膜電位計算式を導出する。

4-2 実験材料および方法

4-2-1 実験材料

高度好塩菌 H. halobium は KH-10 株を使用した。これは光駆動性のクロライドポンプ（ハロロドプシン）をもつ [13] ので、光照射で膜電位（内部負）を発生できる。膜電位の大きさは光強度を変えて調整できる。培養および膜ベシクルの作製は常法 [12, 13] にしたがって行なった。ベシクル内体積は $3.0 \mu\text{l/mg protein}$ であった [15]。タンパク量は牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法 [16] で定量した。測定液は 4M NaCl を 10mM HEPES/NaOH で pH 7.0 に調整して使用した。

脂溶性イオンプローブは TPMP⁺, TPEP⁺, TPPP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺, TPP⁺ を使用した。

4-2-2 測定方法

ベシクルへのプローブのとりこみは、脂溶性イオンに選択的な電極をそれぞれ作製して測定した [12, 17, 21]（詳しくは 2-3-1 と 3-2-2 参照）。光照射法、吸着量およびとりこみ量の計算方法は 2-3-1 に示した方法と同じである。

4-2-3 脂溶性イオン吸着モデル

リポソームあるいは脂質二分子膜において、脂溶性イオンに対する膜内のポテンシャルエネルギープロファイルには、水相－膜相の界面に極小値があることが広く受け入れられている [18]。そのため脂溶性イオンは膜表面付近に存在すると考えられている [20, 22]。

CafisoとHubbell [20]はこの概念をもとにして、スピンラベルしたホスフォニウムイオンのリポソームへの膜電位に依存した吸着を解析した。本研究の第2章2-4-2で、脂溶性イオンの吸着サイトはリポソーム膜の表面付近であり、中央部には存在しないことを実験的に示した。このプロファイルは膜構造を形成する両親媒性分子（脂質）の配列状態に起因する。生体膜は主に脂質とタンパク質から構成されている。タンパク質は脂質二分子膜に埋め込まれたものあるいは膜を貫いているものもある。生体膜の基本構造は脂質二分子膜であるが、膜内プロファイルは脂質二分子膜のように簡単には表わせないと考えられる。膜電位があるとき、吸着の問題をさらに複雑にしている要因は、膜両界面のプローブ濃度が異なることである。従ってここで基本構造に立ち返り、膜内をふたつの領域、膜の外部表面、内部表面に分けて考える（図4-1 参照）。また高度好塩菌膜ベシクルへの吸着はLangmuir型で起こることを、第3章3-3-1で示した。以下はプローブ濃度が希薄で、吸着量がプローブ濃度に比例する範囲で議論する（Langmuir型吸着についての解析は後述）。

脂溶性イオンが主に存在する部分を4つの領域、外液相(o)、膜の外部表面(mo)、膜の内部表面(mi)、内液相(i)に分ける。各領域のプローブ量(moles)をそれぞれ X_o, X_{mo}, X_{mi}, X_i 、体積を V_o, V_{mo}, V_{mi}, V_i 、濃度を C_o, C_{mo}, C_{mi}, C_i とする。図4-1に示した各領域間のプローブ移行の速度定数を k_r ($r = 1 \sim 6$)とする。 X_o, X_{mo}, X_{mi}, X_i の速度式は次のように書ける。

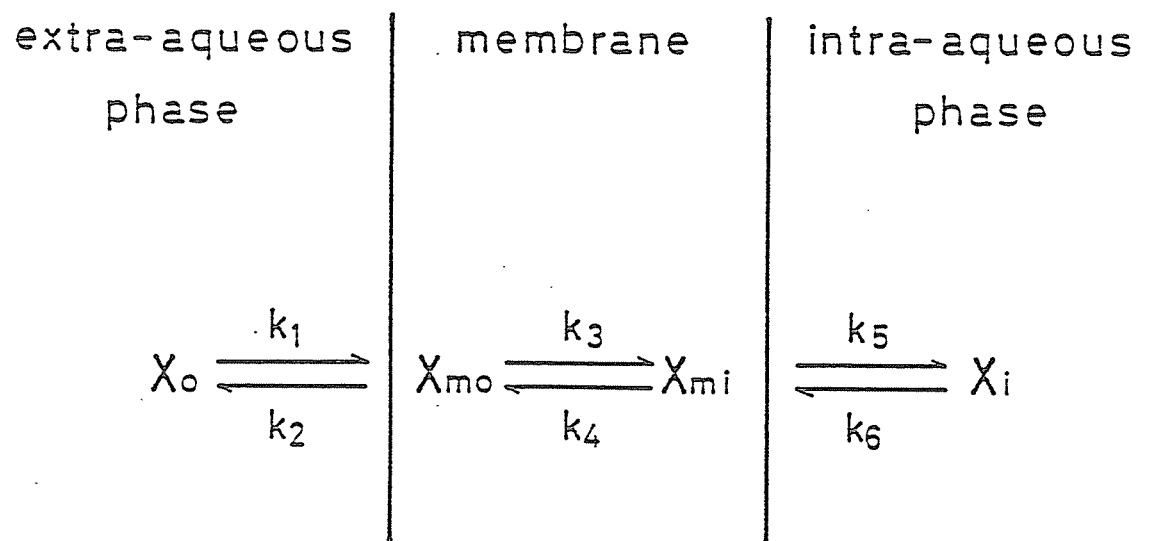


図4-1 脂溶性イオンの吸着およびとりこみの4-コンパートメントモデル。(o) 外液相、(mo)膜外部表面相、(mi)膜内部表面相、(i) 内液相。それぞれのプロープ量(moles)は X_o, X_{mo}, X_{mi}, X_i , 各ステップの速度定数は、 k_r ($r = 1 - 6$) 。

$$dX_o/dt = -K_1X_o/V_o + k_2X_{mo}/V_{mo} \quad (4-1)$$

$$dX_{mo}/dt = k_1X_o/V_o - k_2X_{mo}/V_{mo} - k_3X_{mo}/V_{mi} + k_4X_{mi}/V_{mi} \quad (4-2)$$

$$dX_{mi}/dt = k_3X_{mo}/V_{mi} - k_4X_{mi}/V_{mi} - k_5X_{mi}/V_{mi} + k_6X_i/V_i \quad (4-3)$$

$$dX_i/dt = k_5X_{mi}/V_{mi} - k_6X_i/V_i \quad (4-4)$$

定常状態では $dX_r/dt=0$ ($r = o, mo, mi, i$) となるので、4-1, 4-4より C_{mo} と C_o および C_{mi} と C_i のそれぞれの比が導ける。

$$C_{mo}/C_o = (X_{mo}/V_{mo})/(X_o/V_o) = k_1/k_2 \quad (4-5)$$

$$C_{mi}/C_i = (X_{mi}/V_{mi})/(X_i/V_i) = k_6/k_5 \quad (4-6)$$

従って吸着したプローブ量($X_{mo} + X_{mi}$) は C_o, C_i の関数として次のように表わせる。

$$X_{mo} + X_{mi} = V_{mo}(k_1/k_2)C_o + V_{mi}(k_6/k_5)C_i \quad (4-7)$$

この式は C_o, C_i の交差項はなく、外部表面への吸着は C_o のみの関数として、また内部表面への吸着は C_i のみの関数としてそれぞれ表わされる。脂溶性イオンは膜内を透過して内外に分布しているにもかかわらず、定常状態では、 mo 領域と mi 領域間の連結はない。

4-3 結果と考察

4-3-1 プローブ吸着およびみかけの膜電位

第3章3-3-1では膜電位がないとき（暗所下）のプローブ吸着は、TPMP⁺, TPEP⁺, TPP⁺ではLangmuir型の吸着等温線で示せること、また他のプローブでは高親和性と低親和性のふたつの吸着サイトで起こることを明らかにした。Langmuir型の吸着式(2-4)からわかるように、プローブ濃度が希薄であれば吸着量はプローブ濃度に対して比例する。そこで吸着の解析に4-7式を使うために、希薄濃度範囲で吸着量の測定をおこなった。図4-2に、膜電位 $\Delta\psi=0$ における各プローブの吸着量 $U_b(0)$ を吸着平衡でfreeに存在するプローブ濃度 C_0 に対してプロットした結果を示す。ここで $U_b(0)$ の0は $\Delta\psi=0$ を示す。プローブ初濃度は $2\ \mu\text{M}$ から $20\ \mu\text{M}$ である。どのプローブも吸着量は濃度に比例している（ただしTPAP⁺, TPP⁺, TPBP⁺については $10\ \mu\text{M}$ 以下において）。

光を照射するとベシクル内負の膜電位が発生し、ホスフォニウムカチオンはベシクル内へさらにとりこまれる。プローブ初濃度を1, 2, 4, 6, 10, 15, $20\ \mu\text{M}$ に変えて、同一強度の光照射によるとりこみ量を測定し、膜電位を計算した。結果を図4-3に示した。ここで $\Delta\psi^{\text{app}}$ は吸着補正しないで求めた膜電位である。すなわちベシクル内へとりこまれたプローブが内部ですべてfreeに存在していると仮定して計算した。図4-3Aの横軸はとりこみが平衡したときの外液プローブ濃度 C_0 である。プローブ濃度を増加すると、 $\Delta\psi^{\text{app}}$ が低下する。特にTPAP⁺, TPP⁺などの脂溶性の高いプローブほど、低下が著しい。プローブとりこみの駆動力は膜電位である。言い換えれば、

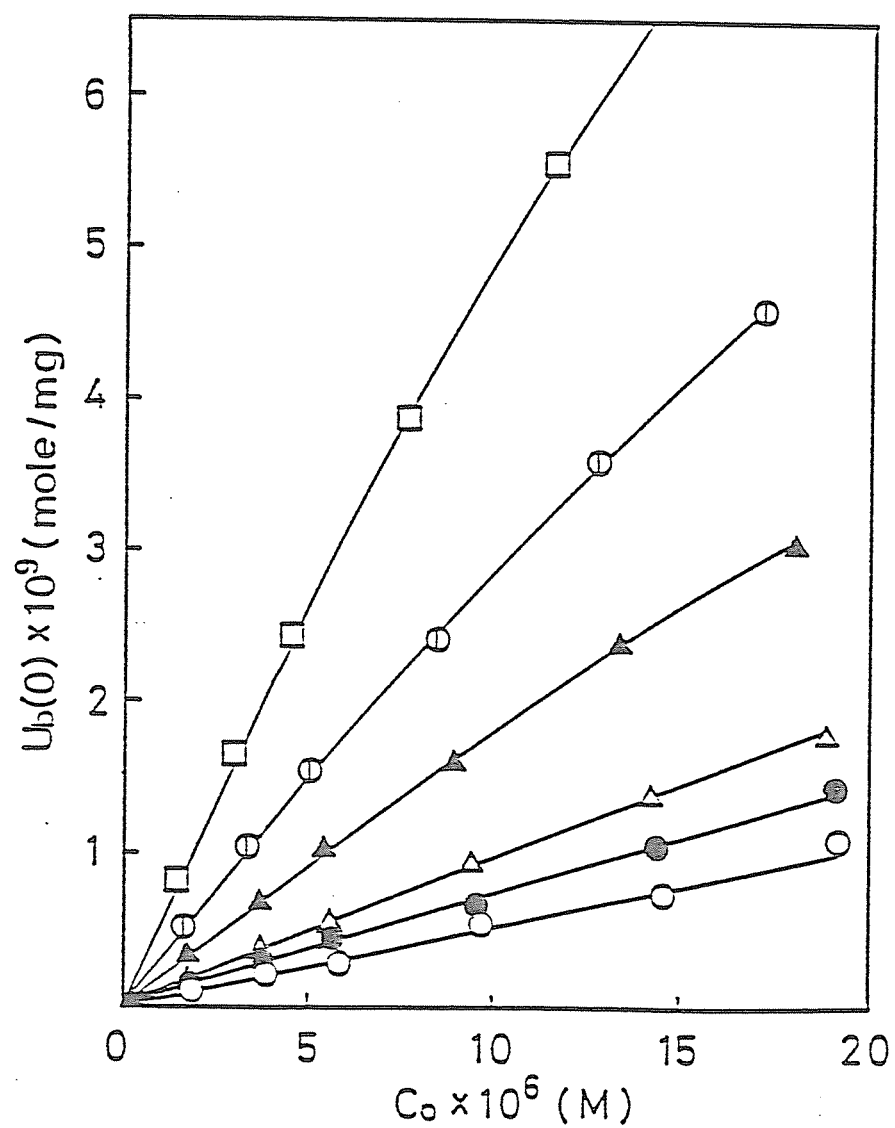


図4-2 $U_b(0)$ 対 C_0 プロット。 $U_b(0)$ は膜電位なしでの吸着量、 C_0 は外液のプロープfree濃度。測定温度：30°C。
○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺ .

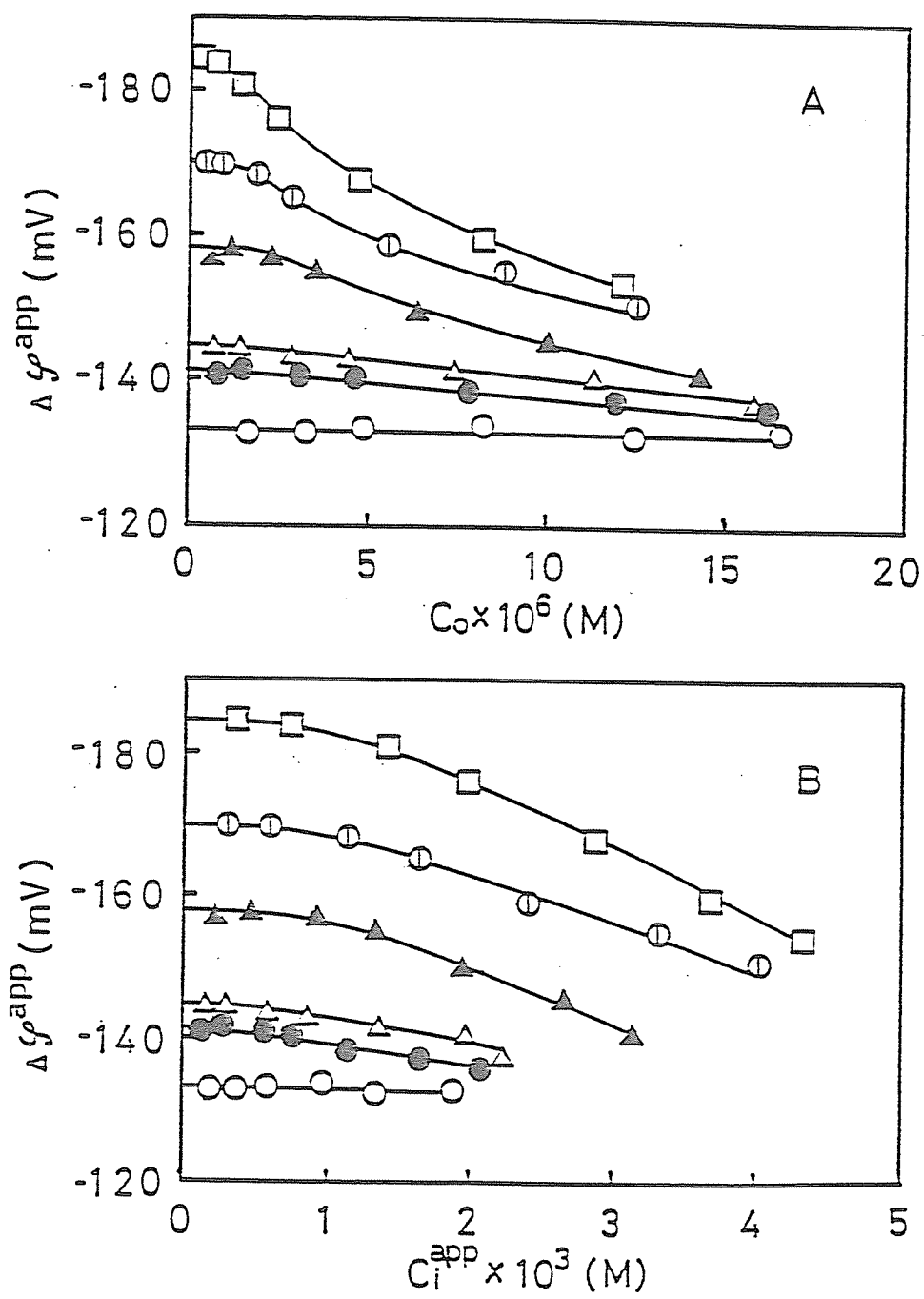


図4-3 A, B それぞれの説明は次ページ参照

図4-3 みかけの膜電位 $\Delta \psi^{app}$ のプローブ濃度による変化。

$\Delta \psi^{app}$ は吸着補正しないで計算した。プローブ初濃度は $1 \mu\text{M}$ から $20 \mu\text{M}$ まで ($1, 2, 4, 6, 10, 15, 20 \mu\text{M}$) 変化させた。ベシクル添加後電極電位が安定してから光照射した。光照射後、とりこみが定常状態になったときの外液濃度を C_o とする。とりこみ量は文献12の方法で計算した。測定温度: 30°C 。光強度: 1120 W/m^2 。

A ; $\Delta \psi^{app}$ 対 C_o プロット。

B ; $\Delta \psi^{app}$ 対 C_i^{app} プロット。 C_i^{app} は吸着補正しないでとりこみ量すべてを free としたみかけの内部濃度。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺ .

プローブは膜電位の電気泳動的な力で受動的にとりこまれるので、等価回路的には、プローブの移動は電氣的ショートに等しい。従って、透過速度が大きいプローブほど、膜電位を低下させる。事実、プローブ初濃度を1 μM から10 μM に増加したときの膜電位の減少は、各プローブの透過速度定数にほぼ比例する（図4-4）。理想的にはプローブ濃度 C_0 をゼロにすれば、プローブ透過による膜電位減少はおこらない。さらに脂溶性イオンの吸着による膜タンパク機能への妨害の可能性についても取り除くことができる。 $\Delta\psi^{\text{app}}$ を C_i^{app} に対してプロットすると、 C_i^{app} が小さいときは、 $\Delta\psi^{\text{app}}$ は一定している（図4-3B）。 C_i^{app} は吸着補正しないでとりこみ量をすべて C_i に換算したみかけの内部濃度である。図4-3A,Bでは縦軸への外挿値が一致する。またプローブの脂溶性が高くなるほど $\Delta\psi^{\text{app}}$ は大きい。これは脂溶性の高いプローブほど吸着しやすいためで（図4-2）、吸着補正しないと膜電位を過大評価することになる[12]。

プローブ初濃度が2 μM ではプローブ濃度の影響はみられず、外挿値とほぼ一致する（図4-3 参照）。そこでプローブ初濃度2 μM で光強度を変え、各プローブについてみかけの膜電位を求めた（表4-1）。この場合もみかけの膜電位は用いたプローブに依存する。最も脂溶性の低いTPMP⁺でもとめた膜電位が最小で、脂溶性の最も高いTPAP⁺が最大値を与える。これらの膜電位の誤差は同一光強度で約60 mVに達し、吸着補正が必要である。

4-3-2 プローブ吸着しない状態への外挿法

第3章3-3-2においてプローブの吸着補正法として膜電位に依存

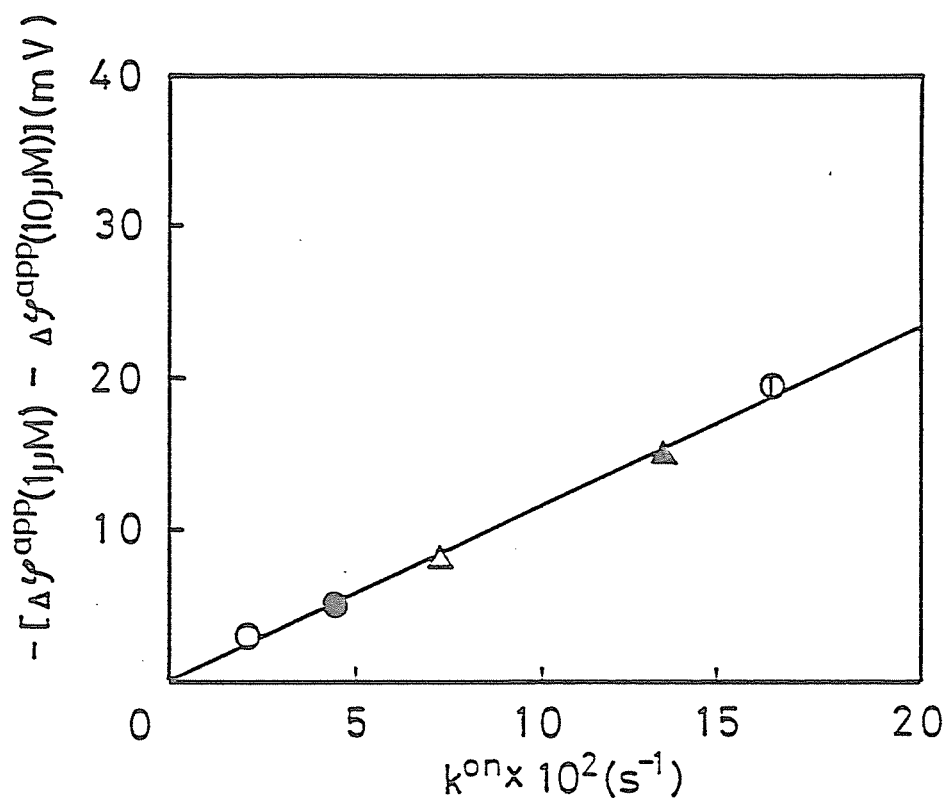


図4-4 膜電位減少量とプローブ透過速度定数 k^{on} の関係。

縦軸はとりこみ平衡時の外液プローブ濃度 C_o が $1 \mu M$ のときのみかけの膜電位 $\Delta\psi^{app}$ と $10 \mu M$ のときの $\Delta\psi^{app}$ の差である。

横軸の速度定数は第3章、表3-3 の値を用いた。測定条件は図4-3と同じである。

○, TPMP+ ; ●, TPEP+ ; △, TPPP+ ; ▲, TPBP+ ; ⊙, TPP+ .

表4-1 各種プローブをもちいて計算したみかけの膜電位(mV)。

みかけの膜電位 $\Delta\psi^{app}$ (mV)は吸着補正しないで計算した。すなわち膜電位によってベシクル内へとりこまれたプローブはすべてfreeに存在していると仮定した。プローブ初濃度は $2\ \mu\text{M}$ である。膜ベシクル(0.61 mg protein/ml) は4 M NaCl, 10 mM HEPES/NaOH(pH 7.0) に分散した。測定温度: 30°C 。光強度 (500 nm 以上) は neutral density filterで変えた。 $1380\ \text{W/m}^2$ を 100%光強度とした。最右列の外挿値(E.V.)は4-14式から得た。

Light(%)	TPMP ⁺	TPEP ⁺	TPPP ⁺	TPBP ⁺	TPAP ⁺	TPP ⁺	E.V.
4.1	-78	-88	-98	-110	-139	-124	-36
9.5	-83	-93	-103	-117	-145	-130	-13
17.8	-95	-99	-111	-125	-152	-139	-32
23.6	-99	-110	-116	-129	-155	-146	-70
32.2	-105	-115	-122	-136	-162	-151	-65
40.0	-109	-121	-128	-139	-166	-156	-74
51.6	-119	-128	-135	-146	-173	-163	-97
64.9	-122	-130	-139	-150	-176	-167	-94
74.6	-125	-134	-141	-154	-179	-169	-93
81.9	-127	-137	-144	-156	-181	-171	-101
90.6	-128	-138	-145	-158	-183	-173	-90
100.0	-131	-140	-147	-160	-186	-175	-100

しない吸着モデル（A）を示した[12]。このモデルは膜電位がないときの吸着が最大吸着量であり、膜電位によって内部にプローブが蓄積されても吸着量は増加しないと仮定して膜電位を求める。表4-1の結果をモデルAで再計算した（表4-2）。正確な膜電位が測定されていることの判断基準は、用いたプローブによらない同一の膜電位が求められることである。しかしながら吸着が膜電位に依存しないとするモデルAでは、膜電位はプローブによって異なっていることがわかる。この補正法で求めた膜電位のプローブ間の誤差は、光強度で変化する。低光強度すなわち膜電位が小さいときは補正の効果は大きく、膜電位が大きいと小さくなる。指数平均モデル[7]あるいは他の補正モデルでもプローブによらない同一の膜電位は求められなかった。第3章3-3-2で正確な膜電位を求める補正法として、'吸着しない状態への外挿法'を提出した。プローブごとに求められた膜電位を吸着に関する量、たとえば膜電位がないときの吸着量、あるいは吸着係数に対してプロットする。プロットを縦軸に外挿した値が実際の膜電位を表わすと考えられる。

みかけのベシクル内プローブ濃度 C_i^{app} は

$$V_i C_i^{app} = X_{m0} + X_{mi} + X_i = U \quad (4-8)$$

$V_i C_i^{app}$ は U に等しい。4-7式、と $\Delta\psi = (RT/F)\ln(C_o/C_i)$ の関係を用いて上式を書き換えると次式を得る。

$$\begin{aligned} U/(V_i C_o) = C_i^{app}/C_o = & V_{m0}k_1/V_{ik2} + V_{mik6}/V_{ik5} \cdot \exp(-F\Delta\psi/RT) \\ & + \exp(-F\Delta\psi/RT) \end{aligned} \quad (4-9)$$

表4-2 膜電位に依存しない吸着モデルで推定した膜電位 (mV)

膜への吸着が膜電位のないときとおなじ、すなわち、膜電位で内部にプローブが蓄積されても吸着量は増加しないと仮定する（第3章3-3-2、モデルA参照）。測定条件は表4-1 と同じである。

Light(%)	TPMP ⁺	TPEP ⁺	TPPP ⁺	TPBP ⁺	TPAP ⁺	TPP ⁺
4.1	-32	-34	-48	-52	-74	-67
9.5	-53	-63	-70	-81	-104	-99
17.8	-79	-83	-92	-103	-124	-118
23.6	-87	-96	-101	-112	-131	-128
32.2	-96	-104	-111	-122	-141	-137
40.0	-101	-111	-119	-128	-148	-144
51.6	-112	-122	-127	-137	-158	-153
64.9	-117	-124	-133	-141	-162	-157
74.6	-121	-128	-135	-147	-166	-161
81.9	-123	-131	-139	-149	-168	-163
90.6	-124	-133	-140	-151	-171	-165
100.0	-127	-136	-143	-153	-174	-167

膜電位がないとき、速度定数を次のように表わす。

$$K_{no} = k_1/k_2, \quad K_{ni} = k_6/k_5$$

膜電位があるとき、吸着係数は電位差の影響を受けるとの考えかたもある。すなわち電位勾配が内部負であるとき、膜の外部表面(mo領域)では吸着を促進するように、また内部表面(mi領域)では膜からの脱着が促進されてもよい。以下に吸着係数あるいは速度定数の膜電位依存性について考察する。

平衡状態では o領域とmo領域との間に次式が成立すると仮定する。

$$\mu^o + RT \ln C_o = \mu^{no} + RT \ln C_{no} + n F \Delta \psi \quad (4-10)$$

ここで nはmo領域に作用する膜電位fraction、 μ^o と μ^{no} はそれぞれ外液と膜外部表面における標準電気化学ポテンシャルである。 $\Delta \psi$ は外液相(o)を基準とした膜電位である。この式から

$$C_{no}/C_o = \exp[(\mu^o - \mu^{no})/RT] \exp[-n F \Delta \psi / RT]$$

4-5 式と対比すると下の関係が導ける。

$$k_1/k_2 = K_{no} \exp(-n F \Delta \psi / RT)$$

$$K_{no} = \exp[(\mu^o - \mu^{no})/RT]$$

同様にmi領域と i領域間では平衡状態で、

$$\mu_{mi} + RT \ln C_{mi} + (1-n) F \Delta \psi = \mu_o + RT \ln C_i + F \Delta \psi \quad (4-11)$$

が成立し、次式が得られる。

$$k_6/k_5 = K_{mi} \exp(n F \Delta \psi / RT)$$

これらの仮定を用いて4-9 式を変形すると、

$$\begin{aligned} C_{iexp}/C_o = & (V_{mo}/V_i) K_{mo} \exp[-n F \Delta \psi / RT] \\ & + (V_{mi}/V_i) K_{mi} \exp[(n-1) F \Delta \psi / RT] \\ & + \exp[- F \Delta \psi / RT] \end{aligned} \quad (4-12)$$

膜電位 $\Delta \psi = 0$ では $C_o = C_i$ であるので、吸着量 $U_b(0)$ は次のように表わせる。

$$\begin{aligned} U_b(0) &= X_{mo} + X_{mi} \\ &= (V_{mo} K_{mo} + V_{mi} K_{mi}) C_o = K_b C_o \end{aligned} \quad (4-13)$$

図4-2 では吸着量 $U_b(0)$ は C_o に比例していることを示した。この比例定数が K_b である。また $K_b = V_{mo} K_{mo} + V_{mi} K_{mi}$ である。 f を

$$f = V_{mo} K_{mo} / (V_{mo} K_{mo} + V_{mi} K_{mi})$$

と定義して、4-12式を書き換えると

$$\begin{aligned}
C_i^{\text{app}}/C_o = & [f \exp(-n \Delta \psi / RT) \\
& + (1-f) \exp((n-1) F \Delta \psi / RT)] K_b / V_i \\
& + \exp(- F \Delta \psi / RT)
\end{aligned}
\tag{4-14}$$

同一条件で求めた各プローブの C_i^{app}/C_o をその K_b でプロットしたとき、プロットを結んだ直線の縦軸との切片は $\exp(-F \Delta \psi / RT)$ である。これが前章で '吸着しない状態への外挿法' として提出した方法にあたる。縦軸への外挿値は $K_b=0$ 、すなわち吸着しない仮想的なプローブで求めた値と考えることができる。

4-14式でプロットした結果を図4-5 に示す。どの光強度でもプロットの直線性は良好である。ところがTPP⁺, TPAP⁺の場合、プロットはこの直線よりも多少上側にずれた。この理由は次のように考えられる。図4-2 に示したように脂溶性の高いプローブほど吸着の直線領域が狭く、吸着の飽和はより低濃度側からおこる。たとえば $\Delta \psi = -120 \text{ mV}$ で $C_o=1 \text{ } \mu\text{M}$ のとき、 C_i は $100 \text{ } \mu\text{M}$ である。この濃度では吸着は濃度に対して直線ではなく、4-14式で示した関係からずれると考えられる。一方、図4-5 に示した脂溶性が低いプローブは、吸着が比例する濃度範囲内に C_i が入る。表4-1 に外挿値から計算した膜電位をまとめた。これが実際の膜電位であるとしたときのみかけの膜電位との差は、とりこみ量の内の吸着量に相当する。TPAP⁺では 100%の光強度で86 mVの差があり、ベシクル内に取り込まれたプローブの90%以上が吸着していることになる。とりこみ量（光強度 100%）のうち実際の吸着量の割合はTPMP⁺ 72%、TPEP⁺ 78%、TPPP⁺ 82%、TPBP⁺ 90%、TPP⁺93%、TPAP⁺ 95%である。この序列

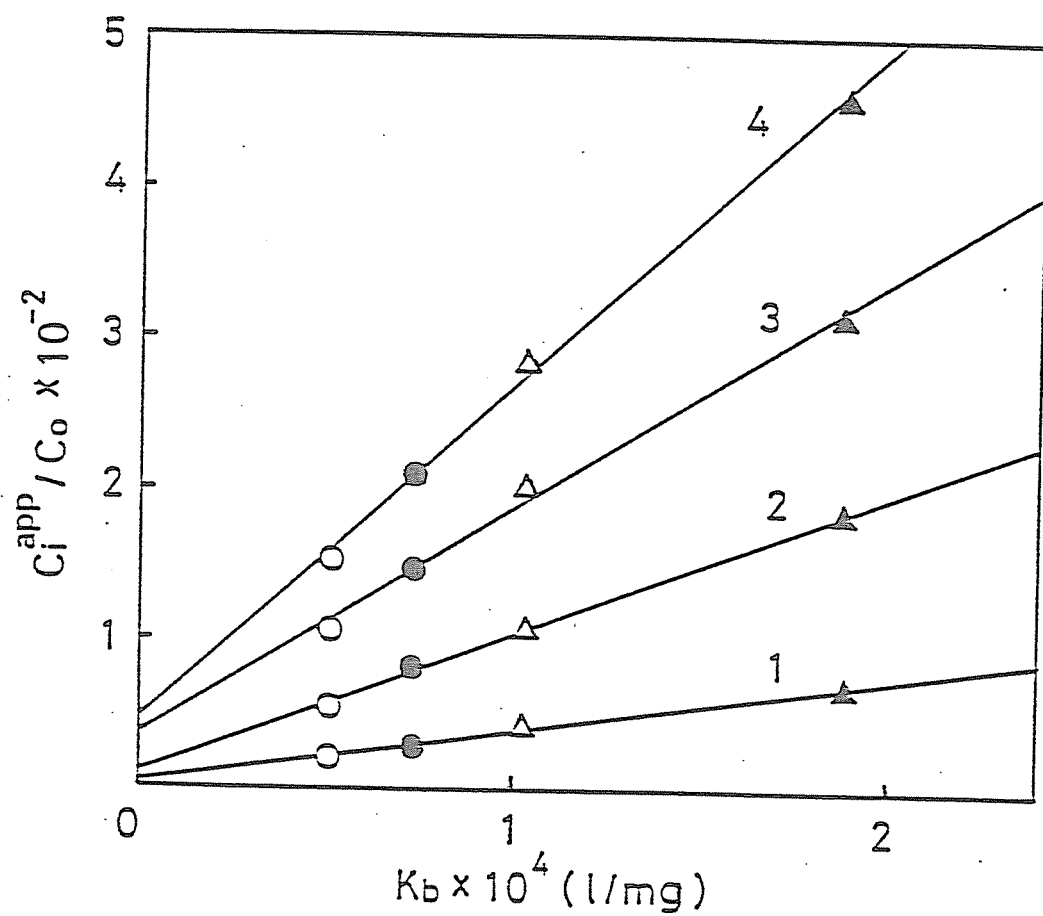


図4-5 C_i^{app}/C_o 対 K_b プロット。

縦軸への外挿値は $\exp(-F\Delta\psi/RT)$ をあたえる(4-14 式参照)。光強度は1,2,3,4 の順に57,442,896,1380 W/m²。プローブ初濃度は2 μM である。他の実験条件は図4-3 と同じである。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺

はプローブの脂溶性と一致する。Shenら[19]はミトコンドリア膜に対するTPP⁺吸着はおよそ85%であることを示している。かれらは valinomycin + Rb⁺ を用い、Rb⁺ のとりこみから膜電位を決定した。高度好塩菌膜ベシクルの場合TPP⁺に関してかれらの値よりわずかに大きい。この原因は測定液が高イオン強度(4 M NaCl)であるため、水相の脂溶性イオンの溶解度が低く、膜へ吸着しやすいためである(ミトコンドリア膜への吸着の詳細については第5章で述べる)。

表4-1の結果は、光強度を増加すると外挿値から計算した膜電位は大きくなることを示すが、わずかにばらつく。高度好塩菌の場合、外挿法は精度よく膜電位を推定するには困難である。図4-5の縦軸は、外挿で膜電位を決定するにはプロットの幅が大きすぎるためであろう。そこでこれらの膜電位を第一次近似として取り扱う。この膜電位を用い、膜電位存在下の吸着量が計算できる。これを $U_b(\Delta\psi)$ と表わす。図4-6に膜電位による吸着量変化を示す。膜電位がないときと同様に、脂溶性の高いプローブほど吸着量が多い。膜電位が大きくなるとベシクル内のプローブ濃度が高くなるため、吸着量は膜電位に依存して増加する。4-14式から吸着量 ($X_{mo} + X_{mi}$)は

$$\begin{aligned} U_b(\Delta\psi) &= X_{mo} + X_{mi} \\ &= [f \exp(-nF\Delta\psi/RT) \\ &\quad + (1-f) \exp((n-1)F\Delta\psi/RT)] K_b C_o \end{aligned} \quad (4-15)$$

4-15式からわかるように、 $U_b(\Delta\psi)/(K_b C_o)$ を膜電位に対してプロットすると、各プローブの吸着量の膜電位による変化は1本の吸着曲線で示せる。このプロットを図4-7に示す。どのプローブでも

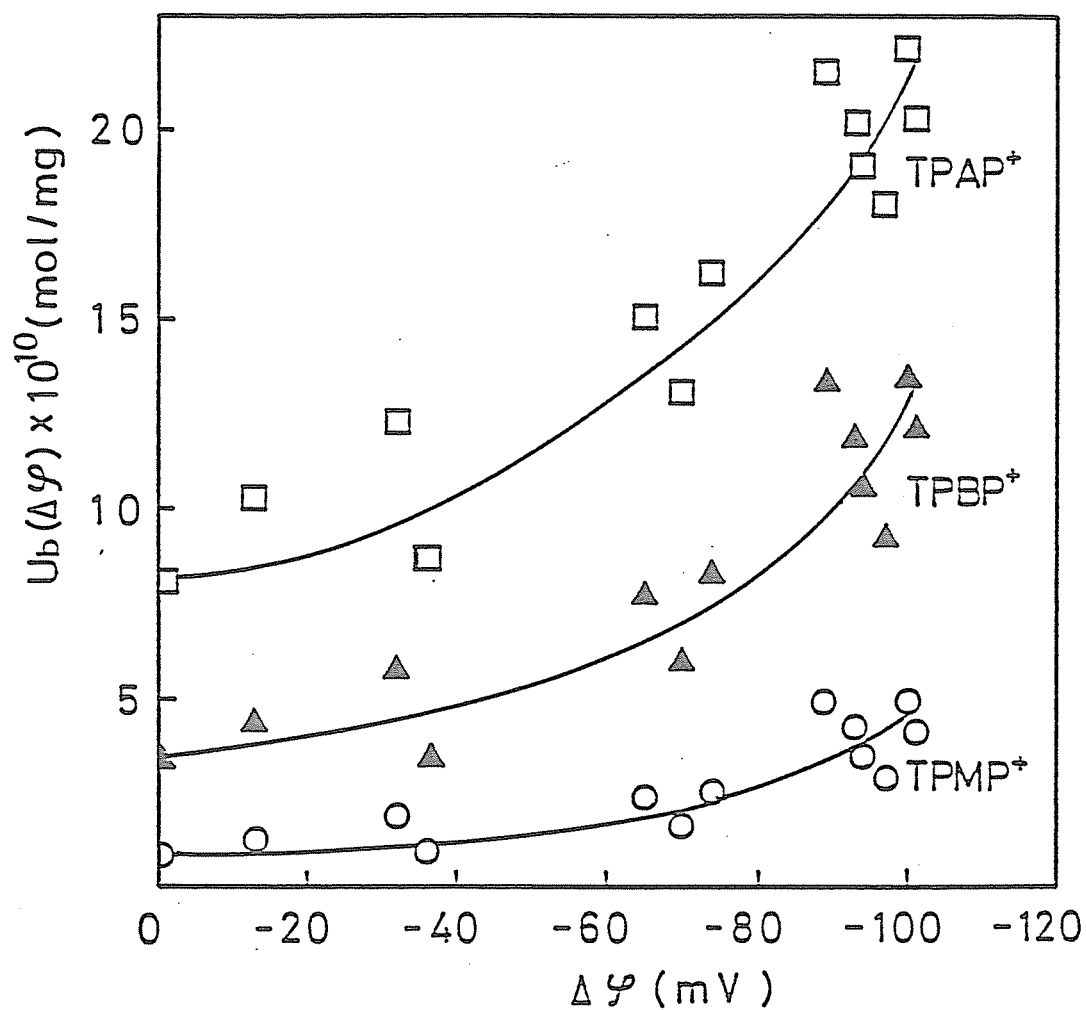


図4-6 膜電位存在下でのプローブ吸着量の変化

$\Delta\psi$ は図4-5の外挿値から求めた。吸着量は膜電位に依存して増加する。実験条件は図4-5と同じである。

○, TPMP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺

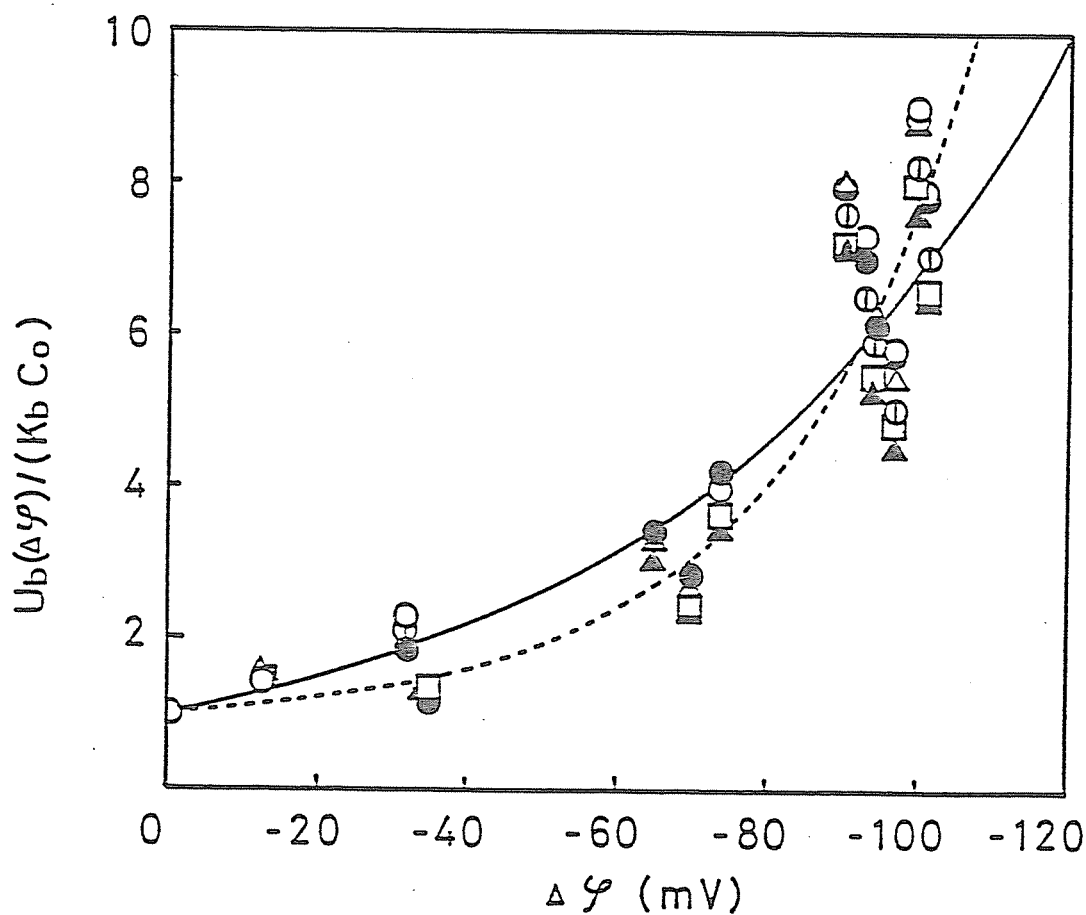


図4-7 $U_b(\Delta\psi)/(K_b C_o)$ 対 $\Delta\psi$ プロット

$\Delta\psi$ は図4-5 の外挿値から求めた。プローブごとに絶対吸着量は異なるが、このように $U_b(\Delta\psi)/(K_b C_o)$ でプロットすると、同様な吸着変化として表わせる。実験条件は図4-5 と同じである。曲線はそれぞれ (----) $n=0, f=0.85$, (—) $n=f=0.5$ として4-15式で示した。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺

ほぼ同じような吸着増加を示す。

前に述べたように脂溶性の高いプローブは吸着の直線性がおちるので、4-14式で厳密には取り扱えない。しかし図4-7のプロットはこの場合でもそれほどずれない。図4-7のプロットに理論式4-15を curve fitting し、ふたつのパラメータ f, n の最適値を非線形最小二乗法で決定した。 $f = 0.85$, $n = 0$ 、または $f = 0.5$, $n = 0.5$ のふたつの組み合わせの可能性が示された（図4-7参照）。プローブに共通した吸着のマスターカーブはこれらの組み合わせの場合が最も誤差が少ない。

4-3-3 プローブ吸着を補正した膜電位式

Cafiso と Hubbell [20] はスピンラベルしたホスフォニウムイオンの膜電位に関連した吸着を報告している。Rottenberg[11]は valinomycin + Rb^+ で膜電位を発生させたミトコンドリアへの脂溶性イオンのとりこみを測定した。彼らは膜電位依存性のプローブ吸着を解析し、吸着係数は膜電位に影響されないこと（これは $n=0$ にあたる）を示した。また Casadioら[8]と Lolkemaら[10]は吸着係数が膜電位に依存しない吸着モデルを示した。 n 値は次の因子によって決まる。(1) 膜内でのプローブ分子が存在する位置、(2) 膜内の電位分布。4-10式から明らかのように、膜内プローブの存在する位置での電位が外液相の電位と等しいならば、吸着係数は膜電位に影響されない。4-14式から $n=0$ とすると次式が得られる。

$$\Delta \psi = (-RT/F) \ln[(U/C_o - fK_b)/((1-f)K_b + V_i)] \quad (4-16)$$

図4-7 の解析から $f=0.85$ と得られた。別の方法から f 値を決めた。膜電位が十分に大きいとき $C_i \gg C_o$ であるので、 $U_b(\Delta\psi)$ はほとんど内側の吸着量 X_{mi} と等しい。従ってこの条件で $U_b(\Delta\psi)/C_i$ から内側の吸着係数 ($V_{mi}K_{mi}$) が求められるので、 f が決められる (4-15式で $n=0$, $C_i = C_o \exp(-F\Delta\psi/RT)$ の関係を用いる)。表4-3 が計算結果である。 $0.83 < f < 0.86$ が得られ、図4-7 の非線形最小二乗法から求めた値とよく一致する。これらふたつの方法から $f=0.85$ であると結論した。 f が 0.5 ではないことは膜の両界面の吸着係数 $K_{mo}V_{mo}$ と $K_{mi}V_{mi}$ が等しくないため、これはたぶん膜の非対称性に起因するためと考えられる。表4-4 に $f=0.85$ とし、プローブ吸着を補正した膜電位式 (4-16式) から計算した膜電位をまとめた。

図4-7 の非線形最小二乗法の解析から、他の n, f の組み合わせ ($n=0.5, f=0.5$) の可能性を示した。 $n=0.5$ のとき、4-14式の f は消去できるので次式のように変形できる。

$$\Delta\psi = (-2RT/F) \ln[-K_b/2V_i + (K_b^2/4V_i^2 + U/C_oV_i)^{1/2}] \quad (4-17)$$

この式から計算した膜電位を表4-5 に示す。

表4-4 ($n=0, f=0.85$)、表4-5 ($n=0.5, f=0.5$) とともに吸着を補正すると、用いたプローブにほとんど依存しない膜電位が得られる。光強度の小さいところでは、表4-4 の方が多少計算値が大きめである。また各光強度での平均値は、外挿法 (表4-1) から求めた膜電位にほぼ等しい。

表4-3 n=0における f の計算

$K_b, U_b(\Delta \psi)/C_i$ の単位は l/mg protein である。光強度は 1380 W/m² (表4-1の100%光強度にあたる)。この方法では膜電位が十分に大きい値である必要がある (本文参照)。C_i は C_o と $\Delta \psi$ (= -100 mV, 表4-1) から計算した。f は 4-15 式を用い、n=0, X_{mo} を省略した式 $f = 1 - [U_b(\Delta \psi)/C_i]/K_b$ で求めた。

PROBE	K _b	U _b ($\Delta \psi$)/C _i	f
TPMP ⁺	5.0 · 10 ⁻⁵	6.8 · 10 ⁻⁶	0.86
TPEP ⁺	7.2 · 10 ⁻⁵	1.1 · 10 ⁻⁵	0.85
TPPP ⁺	1.0 · 10 ⁻⁴	1.5 · 10 ⁻⁵	0.85
TPBP ⁺	1.9 · 10 ⁻⁴	2.7 · 10 ⁻⁵	0.86
TPAP ⁺	4.7 · 10 ⁻⁴	7.9 · 10 ⁻⁵	0.83
TPP ⁺	3.0 · 10 ⁻⁴	5.1 · 10 ⁻⁵	0.83

表4-4 プローブ吸着を補正した膜電位 (n=0)

f=0.85として4-16式から計算した。膜電位(mV)は外液を基準とした値である。各プローブから計算した膜電位の平均値と標準偏差S.D.を求めた。プローブ初濃度は $2 \mu\text{M}$ 。実験条件は表4-1 と同じである。

Light(%)	TPMP ⁺	TPEP ⁺	TPPP ⁺	TPBP ⁺	TPAP ⁺	TPP ⁺	Average
9.5	-26	-31	-36	-33	-41	-34	-34 ±3.7
23.6	-56	-61	-59	-56	-59	-62	-59 ±1.8
51.6	-82	-84	-84	-80	-84	-85	-83 ±1.3
81.9	-91	-93	-95	-91	-93	-95	-93 ±1.3
100.0	-95	-97	-98	-96	-99	-99	-97 ±1.2

表4-5 プローブ吸着を補正した膜電位 (n=0.5)

4-17式から計算した。膜電位(mV)は外液を基準とした値である。各プローブから計算した膜電位の平均値と標準偏差S.D.を求めた。プローブ初濃度は $2 \mu\text{M}$ 。実験条件は表4-1 と同じである。

Light(%)	TPMP ⁺	TPEP ⁺	TPPP ⁺	TPBP ⁺	TPAP ⁺	TPP ⁺	Average
9.5	-14	-17	-22	-18	-24	-18	-19 ±2.6
23.6	-44	-50	-47	-42	-45	-49	-46 ±2.2
51.6	-79	-81	-81	-75	-80	-82	-80 ±1.8
81.9	-92	-95	-98	-93	-95	-99	-95 ±2.0
100.0	-98	-100	-103	-100	-101	-106	-101 ±2.0

吸着の補正が正しく行なわれたとき、求められる膜電位はプローブによらない同一の値となる。膜電位に従った吸着が4-15式で表わされるとき、最適の n, f とは各プローブの吸着補正後の膜電位の偏差が最小の場合である。図4-8は n と f を任意にとり、各プローブ(6種類)で求めた膜電位の標準偏差(S.D.)の変化をシュミレーションした鳥瞰図である。図4-9Aは図4-8の $n=0$ で f を変えたとき、また図4-9Bは $f=0.85$ で n を変えたときのそれぞれのS.D.の変化を示す。これらの解析からS.D.は $n=0, f=0.85$ で最小値をとることがわかる。

厳密にはプローブ吸着はLangmuir型の吸着式(2-4)に従う(第3章3-3-1)。膜の両界面の吸着がそれぞれLangmuir型であるとして、パラメータ n, f を用いて表わすと

$$U(\Delta\psi) = fAC_o/[K\exp(nF\Delta\psi/RT) + C_o] \\ + (1-f)AC_i/[K\exp(-nF\Delta\psi/RT) + C_i] \quad (4-18)$$

反復法(第3章3-3-2)で吸着量 $U_b(\Delta\psi)$ 、 $\Delta\psi$ を求めた。各プローブ(6種類)の標準偏差(S.D.)の変化を図4-10に示す。この場合、 $n=0, f=0.9$ でS.D.は最小となり、吸着がプローブ濃度に比例する吸着式4-15の結果とほとんど同じ n, f 値である。これらの吸着式でどちらも $n=0$ である結果は、吸着係数が膜電位の影響を受けないことを支持する。またスピンプローブ(第2章2-1参照; probe I)を用い、高度好塩菌膜ベシクルの膜電位と吸着量の関係を測定している(J. Goda 卒業論文、北海道大学)。ESRから膜電位存在下の吸着量を直接測定した結果、 $n=0, f=0.8$ で最もよく実験結果を説明することが示された。膜電位計算の実用面を考えると、吸着補正は、

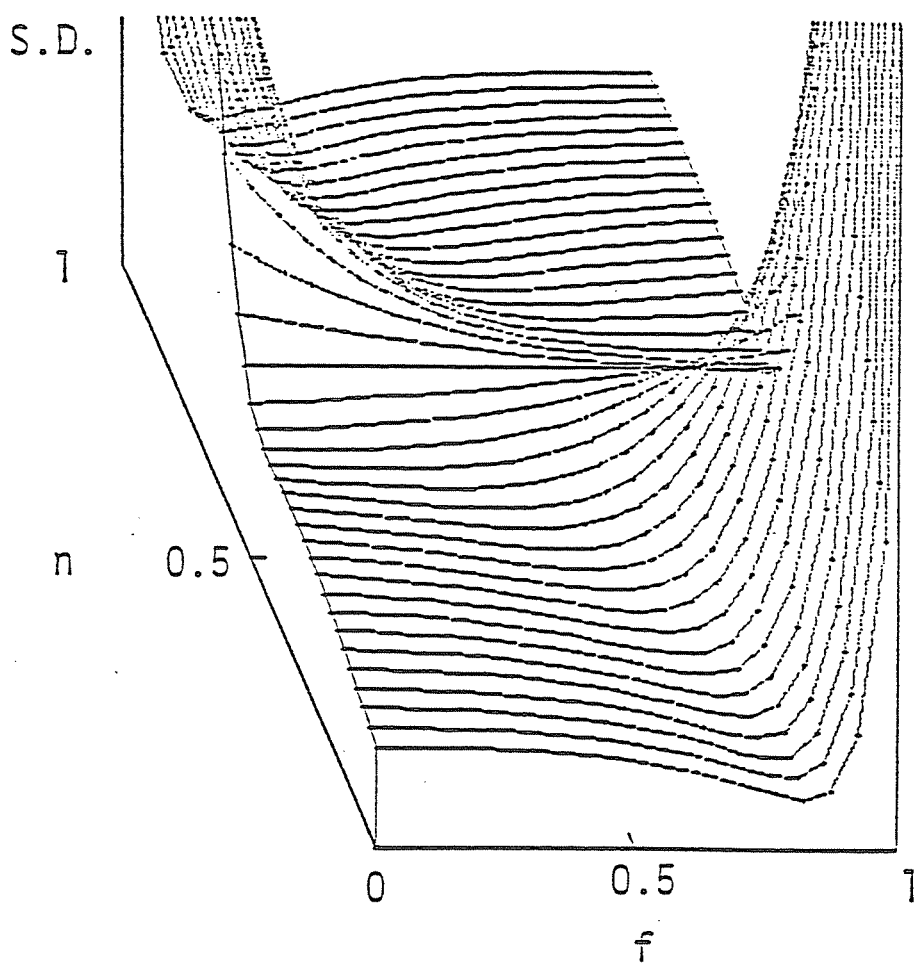


図4-8 f 対 n 対 S.D. プロット（鳥瞰図）。

4-15式の n, f を任意にとり(X,Y方向)、そのときの吸着量を補正して求めた膜電位のプローブ間の偏差をZ方向にプロットした。光強度 1380 W/m^2 。他の測定条件は表4-1と同じである。

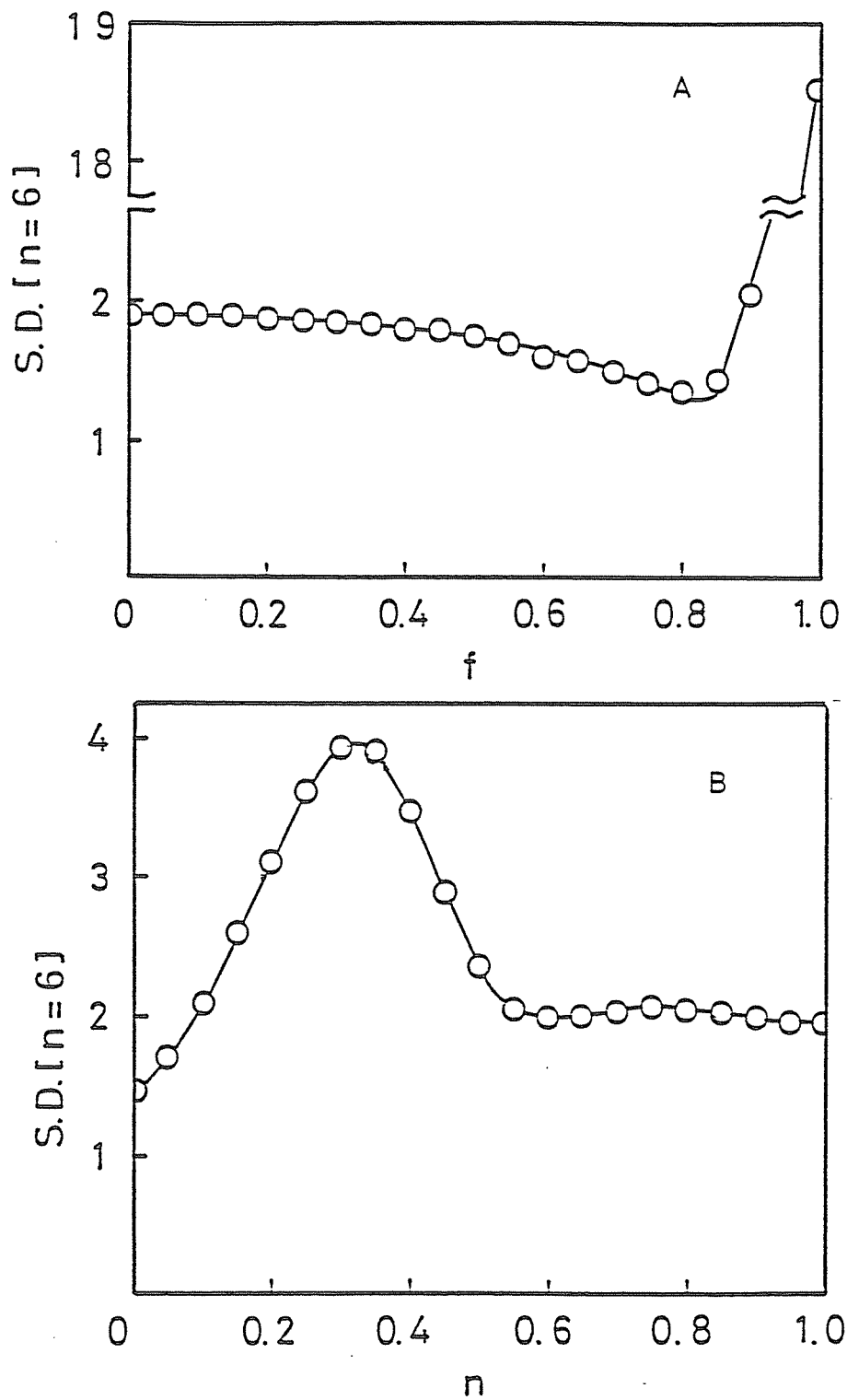


図4-9 パラメータ f , n と膜電位計算値のプロープ間標準偏差

図4-9A ; 図4-8 の $n=0$ で f を変えたときの S.D. の変化、図4-9B ; $f=0.85$ で n を変えたときの S.D. の変化。これらの解析から S.D. は $n=0$, $f=0.85$ で最小値をとる。

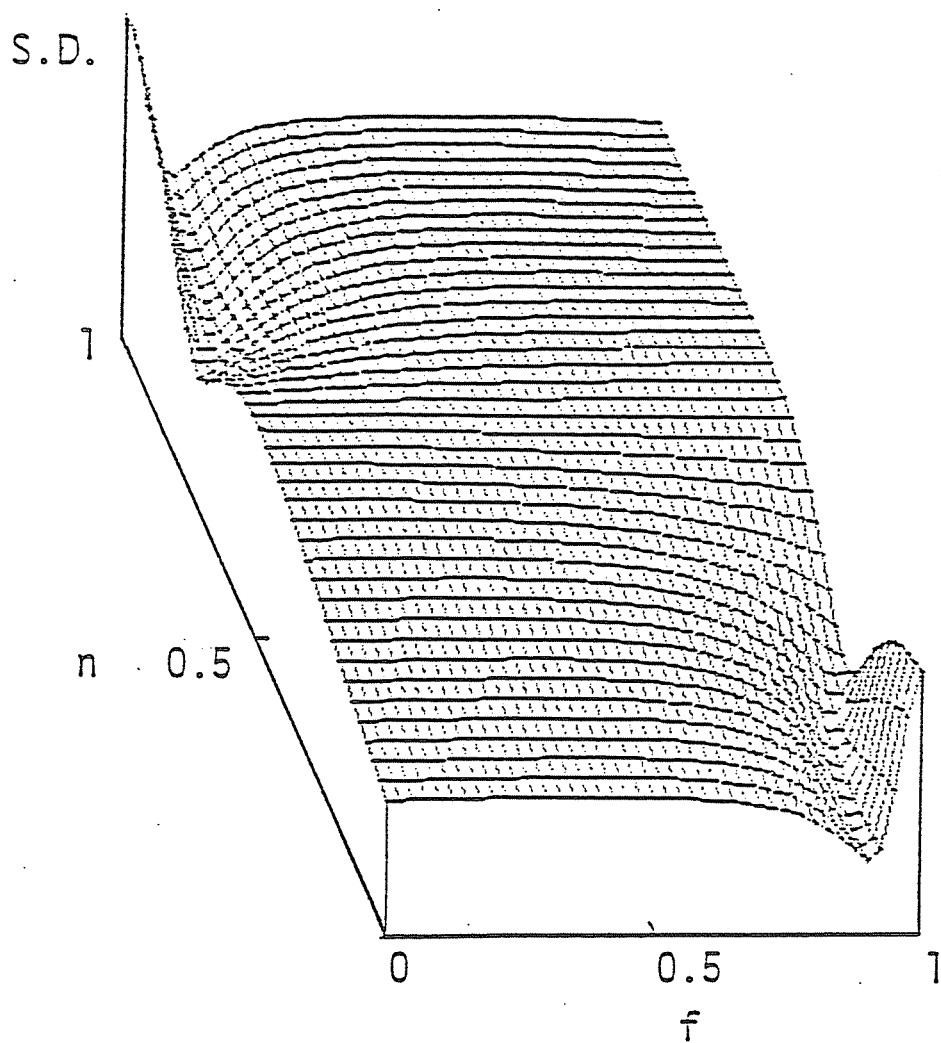


図4-10 f 対 n 対 S.D.プロット

Langmuir型吸着式(4-18式)で f, n を任意に取り、吸着量を補正して計算した膜電位のプローブ間の偏差をZ軸方向にプロットした。測定条件は表4-1と同じである。 $n=0, f=0.9$ でS.D.は最小値をとる。

4-18式よりも、解析的に計算できる4-16式で行なう方が便利である。
用いるプローブのサンプルへの吸着係数 K_b とパラメータ f が明らか
なとき、4-16式を用いれば実測値 U, C_o から実際の膜電位が計算でき
る。

4-4 まとめ

高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着を膜電位の無い状態とある状態でそれぞれ測定した。脂溶性イオンはTPP⁺および同族体 (Phe)₃-P⁺-(CH₂)_n-CH₃ (n = 0 - 4) を使用した。プローブ濃度が希薄なとき、吸着量はプローブ濃度に比例する。光照射で、内部負の膜電位が発生し、プローブが内部へとりこまれる。膜電位測定のためのプローブ濃度は2 μMとした。真の膜電位は、吸着しない状態への外挿法で求められる。各プローブのC_{i^{app}}/C_oを吸着係数でプロットする。ここでC_{i^{app}}はみかけの内部濃度で、とりこみ量から吸着補正しないで求めた値である。縦軸への外挿値は膜電位に従って内外に分布した真の濃度比である。従ってこの値から膜電位が計算できる。

膜電位に依存した吸着量変化を理論的に明らかにした。膜相の吸着サイトは外部表面と内部表面に分離できる。それぞれのサイトへの吸着は、これと接する水相のプローブ濃度に比例する。この吸着機構の解析から、プローブ吸着を補正した膜電位式(4-16)を得た。

$$\Delta \psi = (-RT/F) \ln[(U/C_o - fK_b)/((1-f)K_b + V_i)]$$

ここでU, C_o, K_b, V_i, fはそれぞれとりこみ量、外液濃度、吸着係数、内部体積、吸着係数K_bのうち、外部表面で占める割合である。あらかじめサンプルのK_bとfを測定しておけば、実測値U, C_oから膜電位が計算できる。

引用文献

- 1 Mitchell,P.(1961) Nature 191,144-148.
- 2 Grinius,L.L.,Jasaitis,A.A.,Kadzianskas,Yu.P.,Lieberman,
E.A.,Skulachev,V.P.,Topali,V.P.,Tsofina,L.M. and
Vlanoimirova,M.A.(1970) Biochim.Biophys.Acta 216,1-12.
- 3 Harold,F.M. and Papineau,D.(1972) J.Membrane Boil. 8,27-
44.
- 4 Ramos,S.,Schuldiner,S. and Kaback,H.R.(1979) Methods
Enzymol. 55,680-688.
- 5 Rottenberg,H.(1979) Methods Enzymol. 55,547-569.
- 6 Kamo,N.,Muratsugu,M.,Hongoh,R. and Kobatake,Y.(1979)
J.Membrane Biol. 49,105-121.
- 7 Zaritsky,A.,Kihara,M. and Macnab,R.M.(1981) J.Membrane
Biol. 63,215-231.
- 8 Casadio,R.,Venturoli,G. and Melandri,B.A.(1981) Photo-
biochem.Photobiophys. 2,245-253.
- 9 Bakker,E.P.(1982) Biochim.Biophys.Acta 681,474-483.
- 10 Lolkema,J.S.,Abbing,A.,Hellingwerf,K.J.and Konnings,W.N.
(1983) Eur.J.Biochem. 130,287-292.
- 11 Rottenberg,H.(1984) J.Membrane Biol. 81,127-138.
- 12 Demura,M.,Kamo,N. and Kobatake,Y.(1985) Biochim.Biophys.
Acta 812,377-386.
- 13 Hazemoto,N.,Kamo,N.,Tsuda,M.,Kobatake,Y. and Tareyama,Y.
(1984) Biophys.J. 45,1073-1077.

- 14 Schobert, B. and Lanyi, J.K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 10306-10313.
- 15 Kamo, N., Takeuchi, M., Hazemoto, N. and Kabatake, Y. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 221, 514-525.
- 16 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1953) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 17 Kamo, N., Racanelli, T. and Packer, L. (1982) Methods Enzymol. 88, 356-360.
- 18 Andersen, O. and Fuchs, M. (1975) Biophys. J. 15, 795-829.
- 19 Shen, C., Boens, C.C. and Ogawa, S. (1980) Biochim. Biophys. Res. Commun. 93, 243-249.
- 20 Cafiso, D.M. and Hubbell, W.L. (1978) Biochem. 17, 187-195.
- 21 Damura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) Biochim. Biophys. Acta 820, 207-215
- 22 Benz, R., Lauger, P. and Janko, K. (1976) Biochim. Biophys. Acta 455, 701-720

第5章 ミトコンドリアへの脂溶性イオン吸着を補正した 膜電位測定

5-1 緒言

今日、バクテリアやオルガネラなどの微小細胞には膜電位が発生しており、代謝系や運動に関係していることが広く認められている。Mitchellの化学浸透圧説では、酸化リン酸化の駆動力は、膜を隔てて存在するプロトンの電気化学ポテンシャル $\Delta \mu_{H^+}$ である。また $\Delta \mu_{H^+} = F\Delta \psi - 2.3RT\Delta pH$ である。Mitchell[16]はミトコンドリアに膜電位 $\Delta \psi$ があることをvalinomycin + K^+ を使い、呼吸活性化に伴う外液 K^+ 濃度の減少で示した。すなわちこの減少は、外液を基準としてマトリックス内負の膜電位に従って、 K^+ が内部へとりこまれるためである。このとりこみが K^+ の電気化学ポテンシャル勾配に従っていれば、次式から膜電位が求められる。

$$\Delta \psi = (RT/F)\ln(C_o/C_i)$$

ここで C_i, C_o はマトリックス内外の K^+ 濃度である。しかし K^+ のとりこみに代謝に関連した能動輸送系があると、単に受動輸送だけで内外に分布しているとは言い難く、上式が適用できるか疑問視する向きもある[17]。そこでSchlachevら[18]はプローブとして人工的な脂溶性イオンを用い、膜内外の分布 C_o/C_i から膜電位を推定した。

なぜなら、生体に元来存在しない分子では、特定の輸送機構がないと考えられるからである。現在、脂溶性イオンとして、 TPP^+ , TPMP^+ がおもに使われている。第1章で示したように、小胞の膜電位を推定するプローブとして、これらの脂溶性カチオンは広く使用されているにもかかわらず、この方法には膜への吸着の問題点が残されている。第4章では、この問題を解決するために、高度好塩菌膜ベシクルを用いて、プローブの吸着と膜電位の関連を考察し、プローブ吸着を補正した膜電位計算式を提出した。

本章ではミトコンドリアへの脂溶性イオンの吸着を測定し、4章で示したプローブ吸着を補正した膜電位計算式の適用を行う。脂溶性イオンは TPMP^+ , TPEP^+ , TPPP^+ , TPBP^+ , TPAP^+ , TPP^+ を使用する。脱エネルギー状態（gramicidin処理で膜電位がない状態）のミトコンドリアに対する各プローブの吸着係数を求める。さらに、succinateでミトコンドリアを高エネルギー化し、プローブとりこみ量から膜電位を計算する。

5-2 実験材料および方法

5-2-1 実験材料

ラット肝臓ミトコンドリアは常法[1]に従って単離した。250 mM sucroseで単離し、3回洗浄後、測定液(125 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Pi, 0.4 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4)に分散した。タンパク質は牛血清アルブミンを標準とし、Lowry らの方法[2]で定量した。ミトコンドリアのマトリックス内体積は、[³H]-water、[¹⁴C]-sucrose を用いて測定された値 1.4 μ l/mg protein[1]を使用した。

脂溶性イオンはTPMP⁺, TPEP⁺, TPPP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺, TPP⁺を使用した。

ミトコンドリアの脱エネルギー化はつぎのように行なった。

2 μ M gramicidin D を含む測定液にミトコンドリアを分散(2mg protein/ml)し、インキュベーション(25°C, 10 min)した。処理後、遠心(6000 $\times$ g, 10 min)で脱エネルギー化したミトコンドリアを得た。単離したミトコンドリア分散液は測定前まで氷冷しておいた。

5-2-2 測定方法

ミトコンドリアの酸素消費量はクラーク型酸素電極(YSI Co.)で測定した。脂溶性イオンのミトコンドリアへの吸着、とりこみは脂溶性イオン選択性電極で測定した。この電極の作製方法および測定方法[1,3]は第2章2-3-1 に述べた方法と同じである。測定液に酸素電極、脂溶性イオン選択性電極をそれぞれ別々に、または同時に浸せきし、電極電位を測定した。それぞれの出力はコンピュータ(NEC PC-9801)にとりこみ、データ解析した。

ミトコンドリアの高エネルギー状態での膜電位の測定は、5mM succinate, 2.5 μ M rotenoneを含んだ測定液を使用した。測定はいずれも25°Cで行なった。

プローブ吸着を補正した膜電位 $\Delta\psi$ の計算[4]には次式（第4章、4-16式）を用いた。

$$\Delta\psi = (-RT/F) \ln[(U/C_o - fK_b)/((1-f)K_b + V_i)] \quad (5-1)$$

ここで U はとりこみ量(mole/mg)、 C_o はとりこみが平衡したときのミトコンドリア外液のプローブ濃度(M)、 V_i はマトリックス内体積(1/mg)、 K_b は吸着係数(1/mg)、 f は吸着係数 K のうち膜の外部表面に関する割合、 R, T, F は通常熱力学定数である。

5-3 結果と考察

5-3-1 脱エネルギー状態のミトコンドリアへのプローブ吸着

ミトコンドリア呼吸速度を測定した（図5-1）。ADP 添加による呼吸速度増加（状態3）が観測され、呼吸調節率(R.C.R.)は約5~7であった。図5-2 は5 mM succinate存在下でミトコンドリアへの膜電位によるTPP⁺とりこみを測定した結果である。ミトコンドリアを測定液に添加すると外液のTPP⁺濃度は急激に減少し、とりこみは一定レベルで安定する。この状態は ATP/ADP比が最も高く、高エネルギー状態（状態4）にある[1,5]。ミトコンドリアは内膜に存在する電子伝達系で膜の外液、内液間にプロトン濃度勾配を形成し、内部負の膜電位が発生する。

状態4 のミトコンドリアにgramicidinを添加すると、とりこまれていたTPP⁺は速やかに排出され、同時に呼吸が速くなる。しかし外液のTPP⁺濃度はミトコンドリア添加前まではもどらない。第3章、第4章において高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオン吸着ととりこみを測定した。膜電位によるとりこみ量にはベシクル内でfreeに存在する量だけでなく、膜への吸着量が含まれることを明らかにした[3,4]。gramicidinはアルカリ金属イオンなどの透過性を促進させるイオノフォアである[14,15]。gramicidin存在下では呼吸がリン酸化から開放され、呼吸速度は大きくなり、膜電位が消失する。この状態のTPP⁺とりこみ量は膜電位がないときのミトコンドリア膜への吸着量である。この吸着量はuncoupler(FCCP 0.1 μ M)存在下の吸着量とほぼ同じであった。図5-3 は gramicidin処理（実験材料 5-2-1 参照）したミトコンドリアへの各種脂溶性イオンの吸着

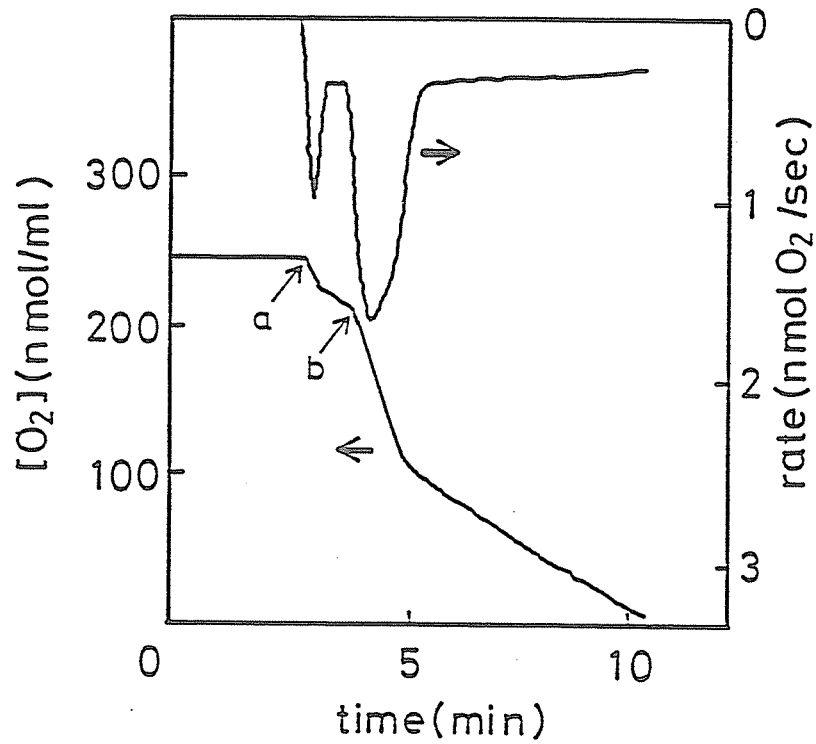


図5-1 ミトコンドリアの酸素消費速度

測定液 (2.5 μ M rotenone, 5 mM succinate, 125 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 5 mM Pi, 0.4 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4) にミトコンドリア (1 mg protein/ml) を添加した(a)。呼吸速度が一定した後、ADP (0.2 mM) を加え(b)、状態3 と状態4 での呼吸速度を測定した。
測定温度: 25°C

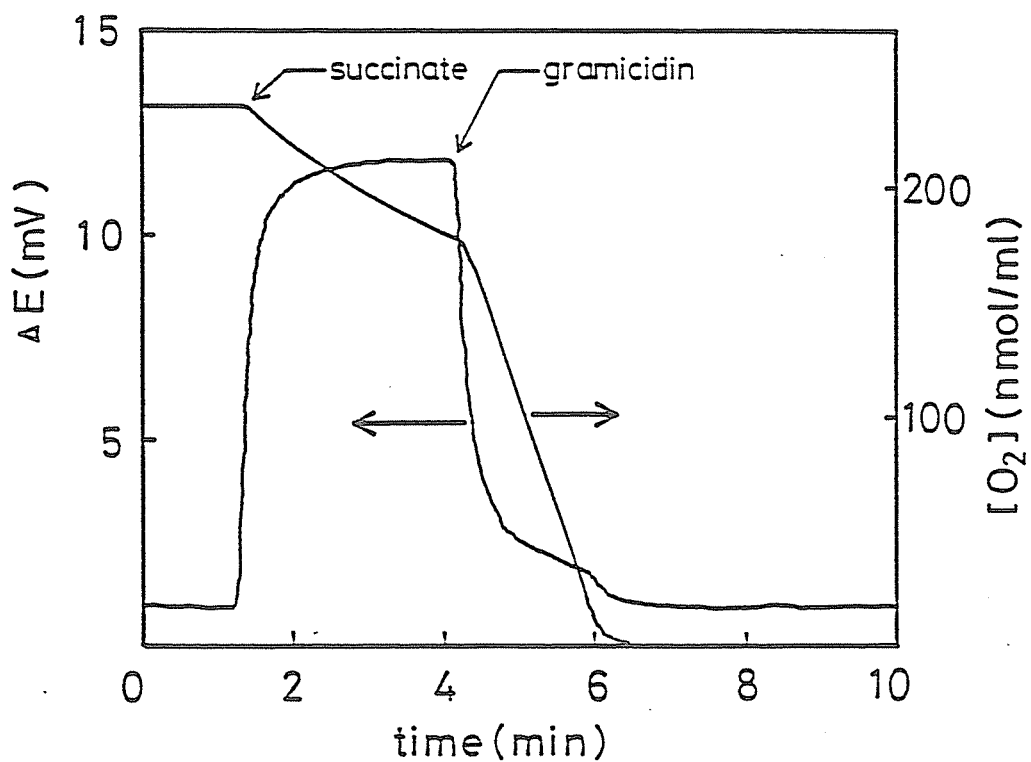


図5-2 状態4におけるTPP⁺とりこみと酸素消費

ミトコンドリアへのTPP⁺とりこみと酸素消費を同時に測定した。

ΔE はTPP⁺電極電位の変化で、ミトコンドリアを入れる前の測定液の電極電位 (TPP⁺初濃度は 2 μM) からの電位変化である。上方向の変化は外液濃度の減少を表す。測定条件は図5-1 と同じである。TPP⁺とりこみが安定してからgramicidin(1 μM)を添加した。

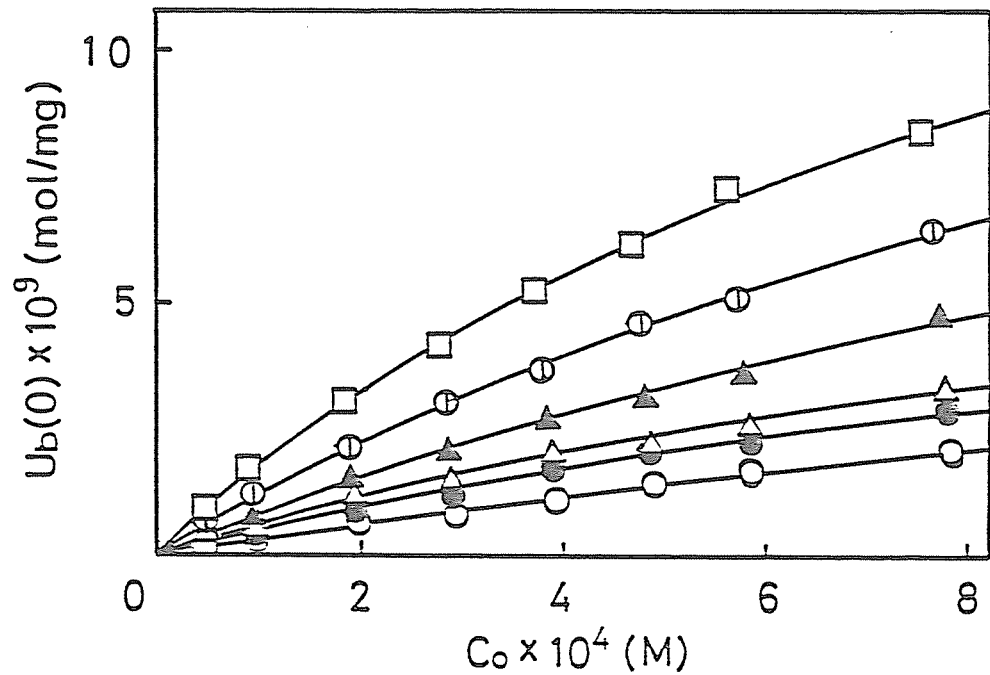


図5-3 膜電位のないミトコンドリアの脂溶性イオン吸着

吸着量 $U_b(0)$ を吸着平衡濃度 C_0 でプロットした。gramicidin処理（実験材料5-2-1 参照）したミトコンドリアは脱エネルギー化されているので、膜電位はない。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺

量を測定した結果である（このミトコンドリアには膜電位は発生していない）。脂溶性の高いプローブほど吸着量が多く、またプローブ濃度を増加させると飽和吸着現象を起こす。この吸着はLangmuir型の吸着であり、高度好塩菌膜ベシクルの場合[3,4]と同様である（図3-2参照）。しかし同一プローブ濃度での吸着量を比較すると、ミトコンドリアの方が少ない。Langmuir型吸着式は濃度が低いとき、吸着量 $U_b(0)$ は濃度 C_o に比例する。

$$U_b(0) = (A/K)C_o = K_b C_o \quad (5-2)$$

ここで K は解離定数、 A は最大吸着量である。また K_b を吸着係数とする。図5-4はプローブ濃度が希薄な範囲（20 μ M以下）で測定した吸着等温線である。図5-4についてLangmuir型吸着式の非線形最小二乗法によるcurve fittingから K, A を決定し、吸着係数 K_b を求めた（表5-1）。脂溶性の高いプローブほど K_b は大きい。ただし高度好塩菌膜ベシクル（表4-2参照）に比べてどのプローブもおおよそ一桁小さい。

5-3-2 高エネルギー状態のミトコンドリアの膜電位

プローブは膜電位 $\Delta\psi$ の測定原理に従ってミトコンドリア内外に C_i/C_o の濃度比で分布するはずである。5 mM succinateで膜電位を発生したときの C_i^{app}/C_o をプローブ濃度を変えて測定した（図5-5）。ここで C_i^{app} はとりこみ量 U を内部体積 V_i でわって求めたみかけのミトコンドリア内部プローブ濃度で、吸着を無視したときの濃度である。同一条件で測定しているにもかかわらず、 C_i^{app}/C_o は

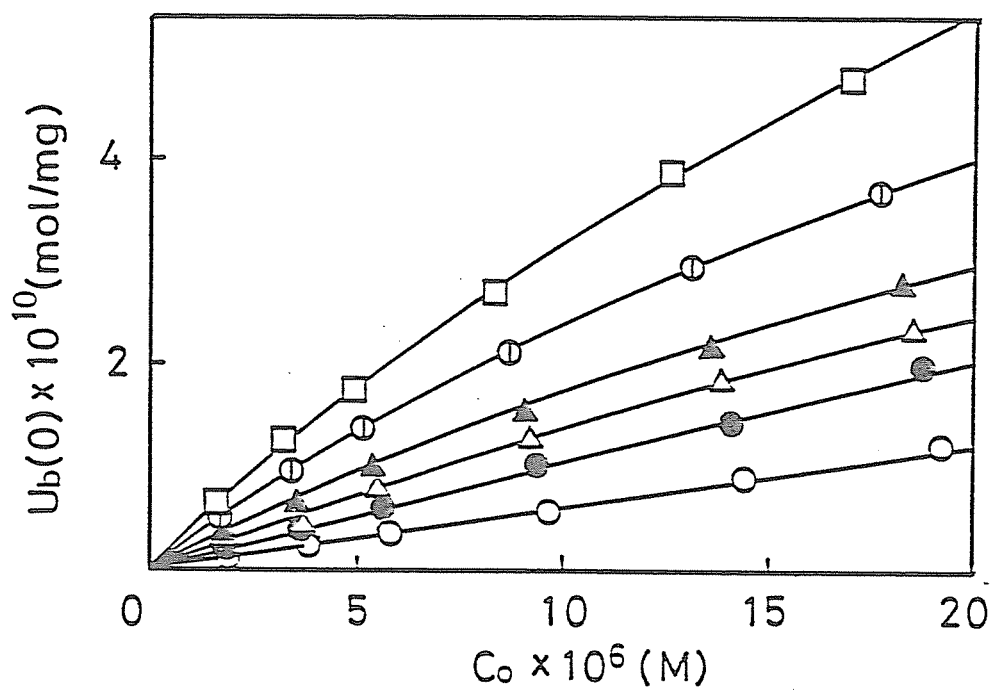


図5-4 膜電位のないミトコンドリアの脂溶性イオン吸着

吸着量 $U_b(0)$ を吸着平衡濃度 C_0 でプロットした。プローブ濃度が希薄 ($20 \mu\text{M}$ 以下) な領域で測定した。

$\circ$, TPMP⁺ ; $\bullet$, TPEP⁺ ; $\triangle$, TPPP⁺ ; $\blacktriangle$, TPBP⁺ ; $\square$, TPAP⁺ ; $\odot$, TPP⁺

表5-1 ミトコンドリア膜への脂溶性イオン吸着定数K,A及び

吸着係数 K_b (25°C)

Langmuir型吸着式の非線形最小二乗法によるcurve fitting から吸着定数K ,Aを求め、吸着係数 K_b を算出した。

PROBE	K (mol/l)	A (mol/mg)	K_b (1/mg)
TPMP ⁺	$1.31 \cdot 10^{-1}$	$7.95 \cdot 10^{-7}$	$6.07 \cdot 10^{-6}$
TPEP ⁺	$8.93 \cdot 10^{-4}$	$9.53 \cdot 10^{-9}$	$1.07 \cdot 10^{-5}$
TPPP ⁺	$7.68 \cdot 10^{-5}$	$1.20 \cdot 10^{-9}$	$1.56 \cdot 10^{-5}$
TPBP ⁺	$6.09 \cdot 10^{-5}$	$1.21 \cdot 10^{-9}$	$1.98 \cdot 10^{-5}$
TPAP ⁺	$4.03 \cdot 10^{-5}$	$1.60 \cdot 10^{-9}$	$3.98 \cdot 10^{-5}$
TPP ⁺	$3.96 \cdot 10^{-5}$	$1.19 \cdot 10^{-9}$	$3.00 \cdot 10^{-5}$

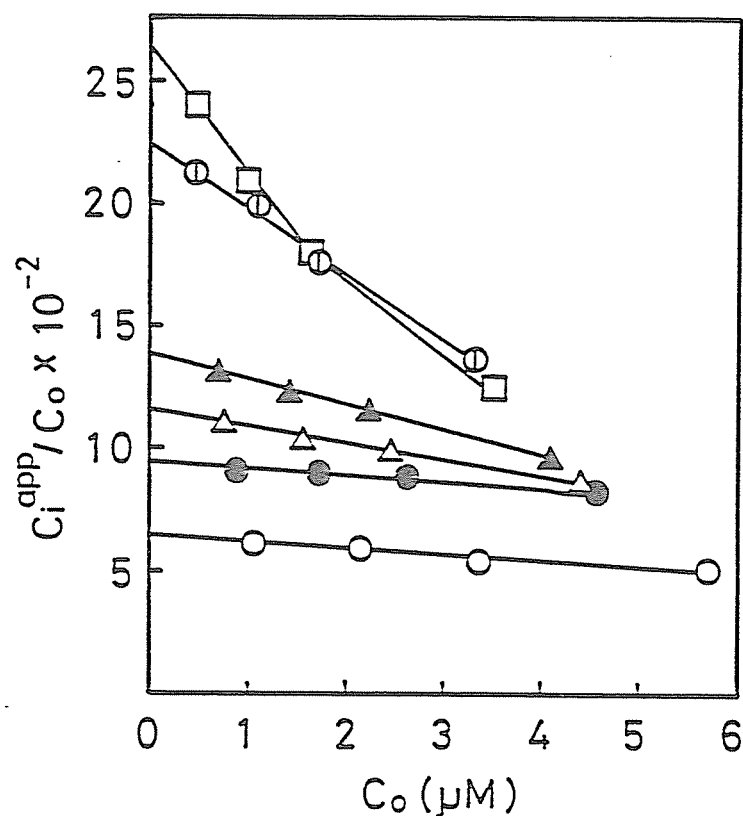


図5-5 C_i^{app}/C_o のプローブ濃度 C_o による変化

5 mM succinate, 2.5 μM rotenoneを含んだ測定液で高エネルギー状態にしたミトコンドリアの膜電位によるプローブとりこみを測定した。 C_i^{app} はとりこみ量 U を内部体積 V_i でわって求めたみかけのミトコンドリア内部プローブ濃度で、吸着を無視したときの濃度である。 C_o はとりこみ平衡での外液濃度である。吸着係数の大きいプローブほど C_i^{app}/C_o は増加する。

$\bigcirc$, TPMP⁺ ; $\bullet$, TPEP⁺ ; $\triangle$, TPPP⁺ ; $\blacktriangle$, TPBP⁺ ; $\square$, TPAP⁺ ; $\odot$, TPP⁺

脂溶性の高いプローブほど大きい。この序列は吸着係数と同じである。またプローブ濃度の C_i^{app}/C_o 変化に与える影響は脂溶性の高いものほど大きい。これらの現象は高度好塩菌膜ベシクルの場合[4]と同じである。前者は吸着量がプローブによって異なるためで、後者はプローブの膜透過係数が違うために起こる。

第4章において '吸着しない状態への外挿法' (4-14式) を理論的に導出し、実験結果をよく説明できることを示した。外挿式は

$$C_i^{app}/C_o = [f \exp(-n F \Delta \psi / RT) + (1-f) \exp((n-1) F \Delta \psi / RT)] K_b / V_i + \exp(- F \Delta \psi / RT) \quad (5-3)$$

である。ここで n は膜外部表面に吸着しているプローブへ作用する膜電位 fractionである。同一条件で測定した C_i^{app}/C_o を K_b でプロットしたとき、縦軸への外挿値から膜電位が求まる。この式はプローブ濃度が希薄で、吸着が濃度に比例するときの外挿式である。

C_i^{app}/C_o のプローブ濃度による影響が全くない状態は図5-5のプロットを $C_o=0$ へ外挿して求められる。この値を求め、5-3式でプロットした(図5-6)。 C_i^{app}/C_o と K_b は直線関係で示される。外挿値 C_i/C_o から計算した膜電位は-147mVであった。この値はRottenberg[6]によって求められた値(valinomycin+Rb⁺法による)とほぼ等しい。 C_i/C_o と C_i^{app}/C_o の差は各プローブの吸着量を表わす。表5-2はとりこみ量のうちの吸着している割合を示した。最も少ないTPMP⁺で60%、TPAP⁺では97%に達する。TPP⁺の場合、Shen[7]はミトコンドリアへの吸着量が約85%である結果を得ており、ほぼ

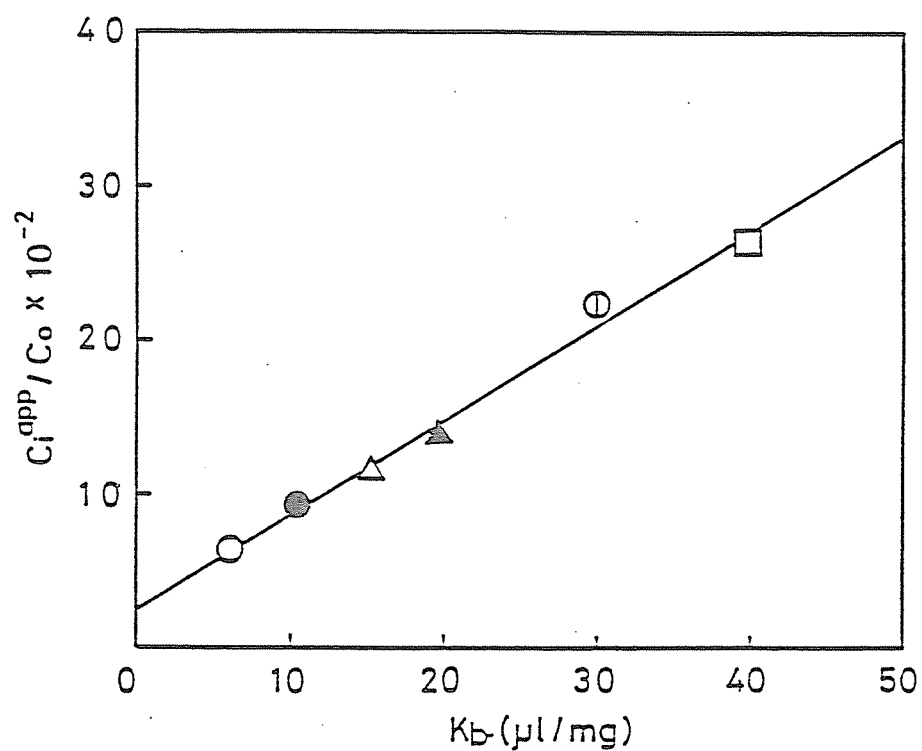


図5-6 C_i^{app}/C_0 対 K_b プロット。

C_i^{app}/C_0 値は図5-5のプロットを $C_0=0$ へ外挿した値を用いた。

他の測定条件は図5-5と同じである。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺

表5-2 膜電位存在下でのプローブ吸着量

5 mM succinate, 2.5 μ M rotenone条件での膜電位は図5-6 の外挿法から求めた。プローブ初濃度は2 μ M。

PROBE	U (n mol/mg)	$U_b(\Delta\psi)/U$
TPMP ⁺	0.90	0.59
TPEP ⁺	1.09	0.70
TPPP ⁺	1.18	0.73
TPBP ⁺	1.25	0.82
TPAP ⁺	1.48	0.97
TPP ⁺	1.44	0.87

一致している。

第4章で述べたように、膜電位存在下のプローブ吸着量 $U_b(\Delta\psi)$ は次式(第4章4-15式)で示される。

$$U_b(\Delta\psi) = [f \exp(-nF\Delta\psi/RT) + (1-f) \exp((n-1)F\Delta\psi/RT)] K_b C_o. \quad (5-4)$$

高度好塩菌の場合、5-4 式では $n=0$ であることを示した[4]。各プローブの吸着量が正しく補正されたとき、求められた膜電位はプローブによらない同一の値となる。 n, f を任意に変えることで最適の n, f (各プローブの吸着量を5-4 式で補正後、膜電位のプローブ間の偏差が最小となるときの n, f) を推定できる。図5-7 は n, f を任意にとった場合の各プローブ(6種類)から求めた膜電位の標準偏差 $S.D.$ の変化を鳥瞰図で表わした。 $S.D.$ が最小となる組み合わせは $n=0$, $f=0.7$ である。すなわちミトコンドリアの場合、 n に関しては高度好塩菌膜ベシクルと同じである。吸着係数は膜電位に依存しないとする条件で膜電位の測定誤差は最小となる($n=0$ のとき5-3 式の勾配から同様に $f=0.7$ がえられる)。また f 値はミトコンドリアの方が高度好塩菌膜ベシクル($f=0.85$) [4] より若干小さい。ミトコンドリアは外膜、内膜から構成されている。膜電位は内膜で発生し、外膜には膜電位は生じない。このような膜の構造上の違い(たとえば膜の非対称性)が f 値に影響すると考えられるが、詳細については明らかでない。

$n=0$ の条件でプローブ吸着を補正した膜電位計算式は5-1 式で示される。この補正式を使い、 $f=0.7$ として膜電位を計算した(表5-

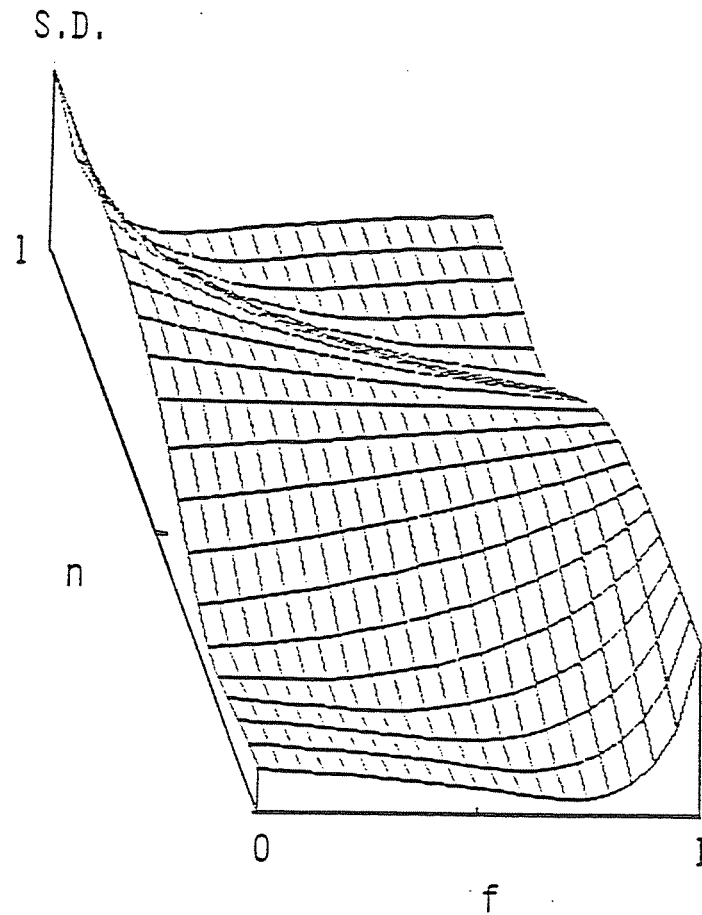


図5-7 f 対 n 対 S.D. プロット（鳥瞰図）。

任意の n, f (X, Y 方向) で 5-4 式から求められる吸着量を補正した膜電位のプローブ間の偏差を、 Z 方向にプロットした。 $n=0, f=0.7$ で偏差は最小となる。

3)。同一条件で求められた膜電位は、gramicidin濃度を調整して膜電位を変化させてもプローブによらない同じ値が得られる。5-1式はミトコンドリアの膜電位測定に有効な実験式として使用できる。

Mitchell[8]の化学浸透圧説では ATP合成の駆動力は、膜を隔てて存在するプロトンの電気化学ポテンシャル $\Delta \mu H^+$ である。また $\Delta \mu H^+ = F\Delta \psi - 2.3RT\Delta pH$ である。状態4 では呼吸鎖と ATP合成系は平衡に近い状態であると考えられている[9]。従って ATP加水分解の自由エネルギー変化 ΔG_p と $\Delta \mu H^+$ はつぎの関係が成立する。

$$\Delta G_p = nF\Delta \mu H^+ \quad (5-5)$$

n は自由エネルギーの容量因子で、ATP 1分子生成するために必要な膜を横切る H^+ 数を意味する。5-3式 から決定した状態4 の $\Delta \psi$ は-147 mVである。この値と、 ΔG_p , ΔpH に加茂ら[1]の測定値を用いると、5-3 式から $n=3$ となった。 n 値についてはさまざまな報告

[1,10-13] があり、いまだ不明な点が多い。酸化的リン酸化機構の化学量論的な解析には $\Delta \psi$ 、 ΔpH をそれぞれ精度よく測定することが不可欠である。脂溶性イオン選択性電極で $\Delta \psi$ を簡易的に精度よく、しかも連続的に求められる方法が確立したことで、さらにミトコンドリアのエネルギー産生機構を定量的に解明できることが期待できる。

表5-3 プローブ吸着を補正した膜電位

f=0.7 として5-1 式から膜電位を計算した。膜電位はgramicidin濃度(G)を調整して変化させた。同一条件で各プローブから計算した膜電位の平均値と標準偏差を求めた。単位 (mV)

G(nM)	TPMP ⁺	TPEP ⁺	TPPP ⁺	TPBP ⁺	TPAP ⁺	TPP ⁺	Average
0	-147	-145	-141	-141	-140	-145	-143 ±2.6
0.2	-142	-146	-143	-140	-136	-143	-142 ±3.1
2.0	-118	-116	-118	-115	-115	-121	-117 ±2.4
20.0	-59	-54	-61	-55	nd	nd	-57 ±2.9

5-4 まとめ

ミトコンドリアへの脂溶性イオンの吸着を測定した。脂溶性イオンはTPMP⁺, TPEP⁺, TPPP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺, TPP⁺を使用した。

gramicidinで脱エネルギー状態にし、膜電位のないミトコンドリアを得た。各プローブの吸着はLangmuir型であり、希薄濃度領域での吸着量は濃度に比例した。

succinateで高エネルギー状態にしたミトコンドリアの、膜電位によるプローブとりこみを測定した。4章で導出したプローブ吸着を補正した膜電位計算式を適用した。この式でプローブによらない同一の膜電位が計算でき、吸着を補正した膜電位計算式が適用できることを明らかにした[19]。

引用文献

- 1 Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y. (1979)
J. Membrane Biol. 49, 105-121
- 2 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.
(1953) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 3 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) Biochim. Biophys.
Acta 812, 377-386
- 4 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) Biochim. Biophys.
Acta 820, 207-215
- 5 Chance, B. and Williams, G. R. (1955) Nature 176, 250-254
- 6 Rottenberg, H. (1984) J. Membrane Biol. 81, 127-138
- 7 Shen, C., Boens, C. C. and Ogawa, S. (1980) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 93, 243-249
- 8 Mitchall, P. (1961) Nature 191, 144-148
- 9 Muraoka, S. and Slater E. C. (1969) Biochim. Biophys. Acta
180, 221-226
- 10 Azzone, C. F., Pozzan, T. and Massari, S. (1978) Biochim.
Biophys. Acta 501, 307-316
- 11 Nicholls, D. G. and Berson, V. S. M. (1977) Eur. J. Biochem.
75, 601-612
- 12 Papa, S. (1976) Biochim. Biophys. Acta 456, 39-84
- 13 Rottenberg, H. (1975) J. Bioenerg. 7, 61-74
- 14 Chappell, J. B. and Crofts, A. R. (1965) Biochem. J. 95, 393-402
- 15 Pressman, B. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 1076-1083

- 16 Mitchell, P. and Moyle, J. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 471-483
- 17 Kamo, N. (1982) Seibutsu Butsuri 22, 59-69
- 18 Grinius, L. L., Jasaitis, A. A., Kadziauskas, Yu. P., Liberman, E. A., Skulachev, V. P., Topali, V. P., Tsofina, L. M. and Vlasimirova, M. A. (1970) Biochim. Biophys. Acta 216, 1-12
- 19 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y., in preparation.

第6章 高度好塩菌膜ベシクルへの脂溶性イオンとりこみの速度論

6-1 緒言

脂溶性イオンは膜電位プローブとして、しばしば用いられる。特に微小電極で直接測定できないような細胞、ベシクルなどの膜電位を推定するには有効な方法である[1-5]。

膜電位プローブとして 'よい' 条件は

- (1) 膜あるいは細胞内器官に吸着しない（膜電位が正確である）
- (2) 膜透過が速い（膜電位に対する応答が速い）

これらの条件をみたすプローブが理想的である。しかしながら(1), (2) は相反する条件であり、吸着の問題は前述のいずれの方法でも免れない。前章まで脂溶性イオンの吸着について論じて来た。第2章ではリポソームについて、第3, 4章では高度好塩菌について、第5章ではミトコンドリアについてそれぞれの吸着について考察してきた。TPP⁺と TPMP⁺ の同族体 $(\text{Phe})_3\text{-P}^+-(\text{CH}_2)_n\text{-CH}_3$ ($n=0-5$) については、プローブの炭素鎖が長く（脂溶性が高く）なるほど吸着量が増加することが明らかとなった。この序列は膜電位の有無で同一であった。第4章で '吸着しない状態' への外挿法を提出した。また吸着補正した膜電位計算式は用いたプローブによらない値が得られ、実験式として有効であることを示した。

本章では高度好塩菌膜の脂溶性イオン透過速度の測定を行なう。上に述べたように 'よい' 膜電位プローブを選択するためには、透過速度の測定が必要である。高度好塩菌膜には光駆動性のイオンポ

ンプ（ハロロドプシン）が含まれている[7,8]。光照射でタンパク質のコンフォメーション変化が起き、励起状態になる。励起状態は光なしで基底状態に数十ミリ秒で緩和し、この光化学サイクルでクロライドイオンが能動輸送される。従って膜の電荷分離は光照射（定常光）で速やかに起こり、膜電位は短時間（数百ミリ秒）で定常状態に達する。事実、膜電位に高速応答する膜内カロチノイドスペクトルから明らかにされている[M. Watanabe (1984) 修士論文、北海道大学]。カロチノイドとハロロドプシンを含むベシクルにフラッシュ光を照射したときのカロチノイドスペクトルのシフトは数百ミリ秒のオーダーで起こる。光消去でイオンポンプはすみやかに停止する。クロライドイオンが輸送されてはいるがベシクル内外は4 M NaClで高塩濃度になっているので、光照射によりイオン組成が大きく変わることは考えられない。従って光消去で膜電位は速やかに消失する。この実験材料はプローブ透過の速度を解析するのに適している。なぜなら膜電位が光で制御できるため、同一サンプルで繰り返し測定が可能だからである。特に光消去だけで膜電位が即座になくなるので、プローブ濃度勾配だけしかないときの透過機構が解析できる。光消去でのプローブとりこみをoff kinetic、光照射時をon kineticとし、とりこみ速度の比較から透過係数の膜電位依存性が得られる。

6-2 実験材料および測定方法

6-2-1 実験材料

高度好塩菌の培養およびベシクルの調製は常法[8,9]に従って行なった。使用した株はKH-10で、光駆動性のイオンポンプとしてハロロドブシンだけが含まれる[8]。脂溶性イオンはTPMP⁺, TPEP⁺, TPPP⁺, TPBP⁺, TPAP⁺, TPP⁺を使用した。TPP⁺は同仁化学、他のプローブは東京化成から購入した。

6-2-2 測定方法

ベシクルへの各脂溶性イオンのとりこみの測定には脂溶性イオン選択性電極をそれぞれ使用した。測定液は4 M NaCl, 10 mM HEPES / NaOH (pH 7.0) を使用した。電極の作製法およびとりこみ測定[5, 6, 8, 10-13]は第2章、第3章の測定方法に述べた方法と同じである。脂溶性イオン選択性電極はベシクル外液のプローブ濃度変化を連続的にモニタできるので、ベシクル内へのプローブ透過機構を速度論的に解析できる。電極の応答時間はプローブ濃度2倍変化で4-7秒であった。電極電位はコンピュータ(NEC PC-9801)に入力し、速度定数 k は第3章で使用した次の一次反応速度式で計算した。

$$U(t) - U_b(0) = (U_e - U_b(0)) [1 - \exp(-k^{on} t)] \quad (\text{on kinetics})$$

$$U(t) - U_b(0) = (U_e - U_b(0)) \exp(-k^{off} t) \quad (\text{off kinetics})$$

(6-1)

ここで $U(t)$ はon kinetics の場合光照射開始からの、off kinetics の場合光消去してからのそれぞれの時刻 t におけるとりこみ量、 U_e は光照射時のとりこみ量の平衡値、 $U_b(0)$ は光照射前のとりこみ量で、 (0) は膜電位 $\Delta \psi=0$ を表わす。光消去後のとりこみ量の平衡値は光照射前の値 $U_b(0)$ と同じである。 E_0, E_1, E_2 をベシクル添加前、光照射前（暗所下）、光照射後のそれぞれの平衡電極電位とする（図6-1 参照）。

$U(t), U_e, U_b(0)$ は次式から求められる [6]。

$$U(t) = (C_0 V_0 / P V_1) [1 - \exp(- F \Delta E_a / RT)] \quad (6- 2)$$

ここで $\Delta E_a = (E(t) - E_0) - (RT/F) \ln((V_0 + V_1)/V_0)$ である。 $E(t)$ は光照射あるいは消去後の時刻 t における電極電位(V) 、 C_0 はプローブ初濃度(M) 、 V_0 はベシクル添加前の測定液の体積(ml)、 V_1 は測定液に添加したストックベシクルサスペンションの体積(ml)、 P はベシクルのタンパク濃度(mg/ml) である。 $U_e, U_b(0)$ はそれぞれ $E(t)=E_2$, $E(t)=E_1$ として計算できる。

6-3 結果と考察

図6-1 に電極電位の経時変化の一例を示す。上方向の電位変化はベシクル外液のプロープ濃度減少に対応した変化、すなわちベシクルへのプロープとりこみ量の増加を表わす。ベシクル添加前の各プロープ初濃度は C_0M である。電極電位が安定したらストックベシクルサスペンション(20~40 mg protein/ml)を少量添加した。膜へのプロープ吸着とサスペンション添加による測定液希釈のために、電極電位が減少する。後者による変化量はすでに第2章に述べた方法[6]で計算できる。膜への吸着が平衡してから光照射した。電極電位はさらに減少(外液プロープ濃度の減少)し、数分で安定する。光を消去すると、電極電位は光照射前のレベルまで回復(ベシクル内に蓄積していたプロープの排出)する。光照射あるいは光消去してからのプロープのとりこみと排出の経時変化をそれぞれ on kinetics, off kineticsとする。

ON KINETICS

図6-2 は光照射したときのプロープとりこみ速度である。プロープ初濃度は $10\ \mu M$ である。6-1 式から速度定数を求めた。図6-2において $-\ln[(U_e - U(t))/(U_e - U_b(0))]$ 対 t のプロットの勾配から on kineticの速度定数が求まる。 t 初期ではプロットは直線となるが、 $U(t)$ が U_e に近くなると直線性は落ちる。この領域での速度定数の計算は正確でない。そこで以後の考察では 初期の勾配から計算した速度定数を on kineticでの値として用いた。速度定数へのプロープ濃度 C_0 の効果を調べた(図6-3)。 C_0 は $1\ \mu M$ から $20\ \mu M$

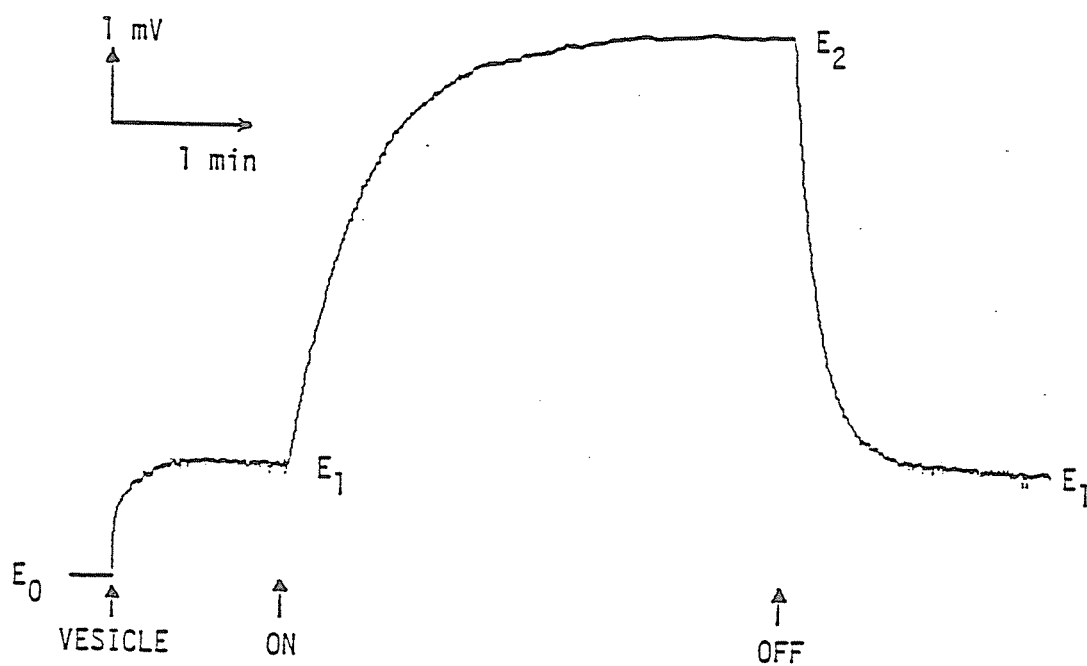


図6-1 脂溶性イオン選択性電極の電極電位変化

上方向の変化がベシクル外液のプロープ濃度減少に対応する、すなわちベシクルへのとりこみを表わす。 $\uparrow$ (ON), $\uparrow$ (OFF) でそれぞれ光照射、消去した。 E_0, E_1, E_2 はそれぞれベシクル添加前、暗所下、光照射後の電極電位の平衡値である。これらの測定から6-2 式でとりこみ速度が計算できる。

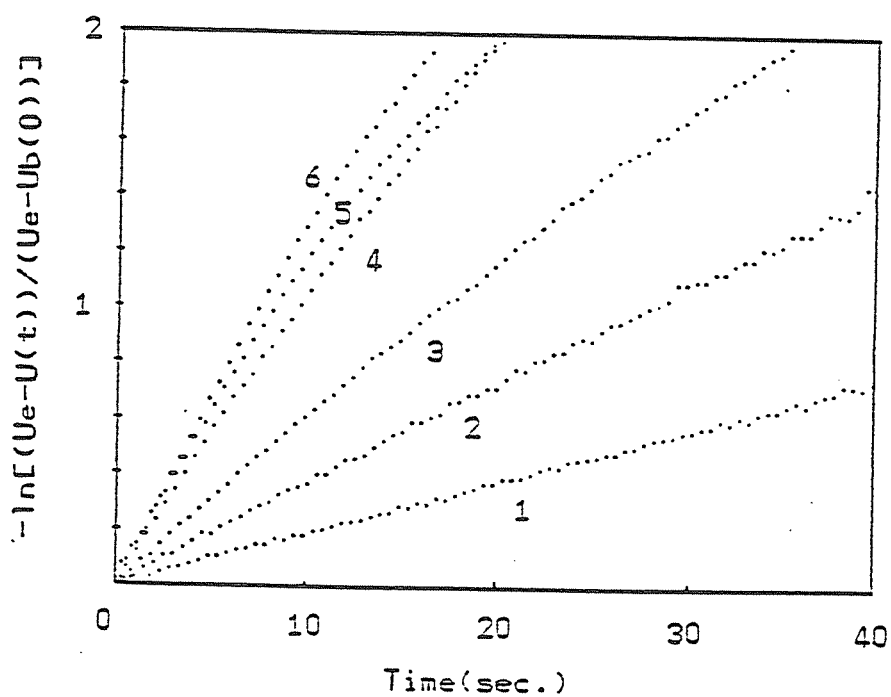


図6-2 $-\ln[(U_e - U(t))/(U_e - U_b(0))]$ 対 t プロット。

初期の勾配から on kinetic の速度定数を求めた。KH-10 ベシクル (1.8 mg/ml) を 4 M NaCl, 10 mM HEPES (pH 7.0) の測定液に分散した。プローブ初濃度は 10 μ M。測定温度 30°C。光強度 (500 nm 以上) は 1120 W/m²。1, 2, 3, 4, 5, 6 はそれぞれ TPMP⁺, TPEP⁺, TPPP⁺, TPBP⁺, TPP⁺, TPAP⁺ を表わす。

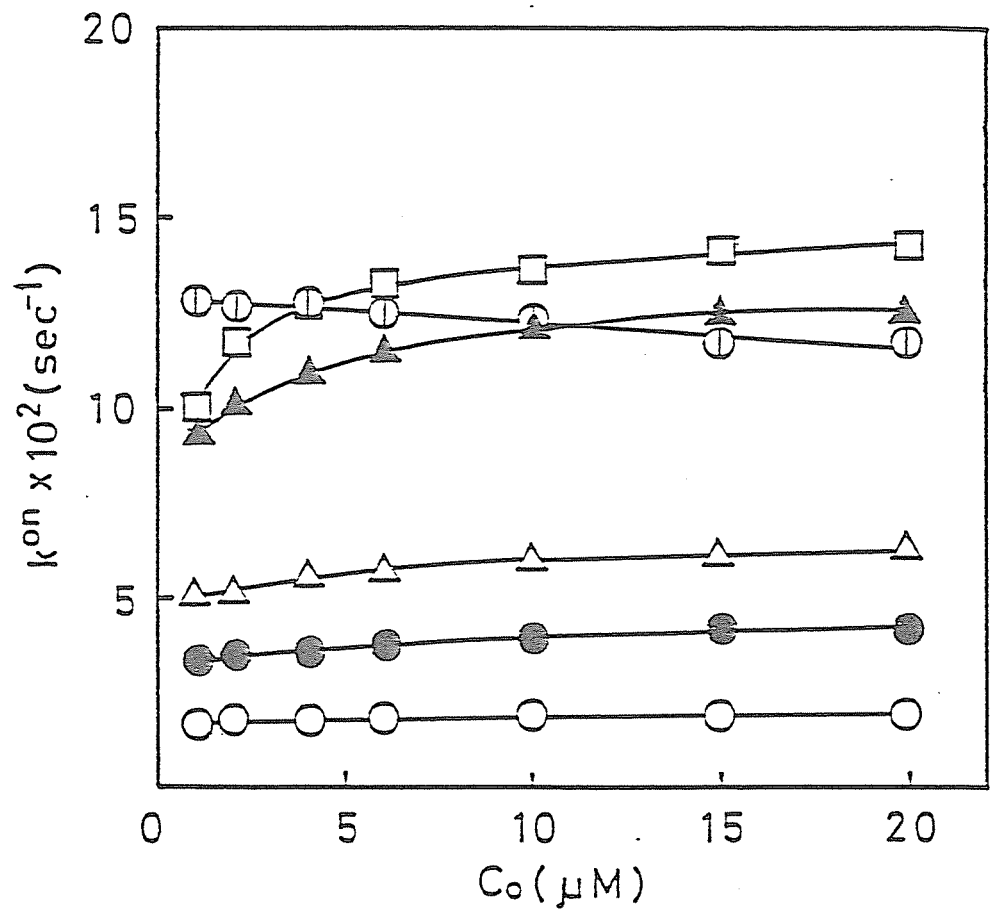


図6-3 速度定数 k^{on} へのプローブ濃度 C_0 の効果

k^{on} は6-1 式で解析した。測定条件は図6-2 と同じである。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺

まで変化させた。 C_0 が20倍違うにもかかわらず、速度定数はほとんどプローブ濃度の影響を受けない。この結果は理論的に予測[文献5 参照]されていたように、プローブとりこみが一次反応で進むことを示唆する。ただしプローブ濃度が希薄な領域でTPAP⁺とTPBP⁺がわずかに C_0 に依存している。この原因については明らかではない。速度定数は C_0 が15 μM または20 μM でTPMP⁺ < TPEP⁺ < TPPP⁺ < TPP⁺ < TPBP⁺ < TPAP⁺の順に大きく、1 μM または2 μM ではTPMP⁺ < TPEP⁺ < TPPP⁺ < TPBP⁺ < TPAP⁺ < TPP⁺である。この序列はほぼ吸着量の大きさと同じである。事実、プローブとりこみの速度定数を吸着係数(表4-2)でプロットすると、直線関係が得られる(図6-4)。

光強度を変えて速度定数の測定をした。ベシクルへ照射する光強度を変えると、膜電位が変化する[14]。膜電位は第4章でのべた方法[6, 17]で測定することができる。プローブ初濃度 $C_0 = 2 \mu\text{M}$ の結果を図6-5に示す。各プローブの速度定数 k^n を膜電位の関数としてプロットした。どのプローブでも k^n は膜電位-80 から-90 mVで極小値をとる。このような結果は $C_0 = 10 \mu\text{M}$ のときでも同様の傾向であった。

OFF KINETICS

図6-6はoff kineticでの速度定数 k^{off} を C_0 でプロットした結果である。 k^{off} は比較的一定した値である。しかしON KINETICの場合と同様に、TPBP⁺, TPP⁺, TPAP⁺の k^{off} の順序は C_0 に依存する。他のプローブについては k^n と順序は同じである。また k^n は C_0 が増加するにつれてわずかに大きくなったが、 k^{off} では逆の傾向である。図

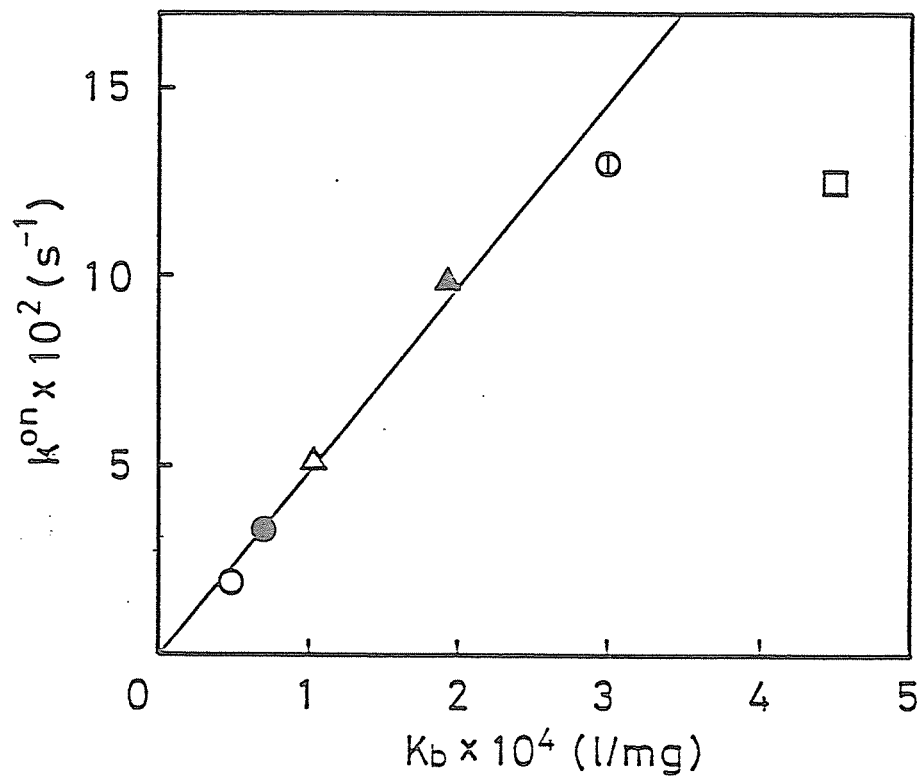


図6-4 とりこみ速度定数 k^n 対 吸着係数 K_b プロット

速度定数 k^n (プローブ初濃度 $2 \mu\text{M}$) を吸着係数 K_b (表4-2) に対してプロットした。TPAP+の直線性からのずれは解析上の誤差と考えられる。

○, TPMP+ ; ●, TPEP+ ; △, TPPP+ ; ▲, TPBP+ ; □, TPAP+ ; ⊙, TPP+

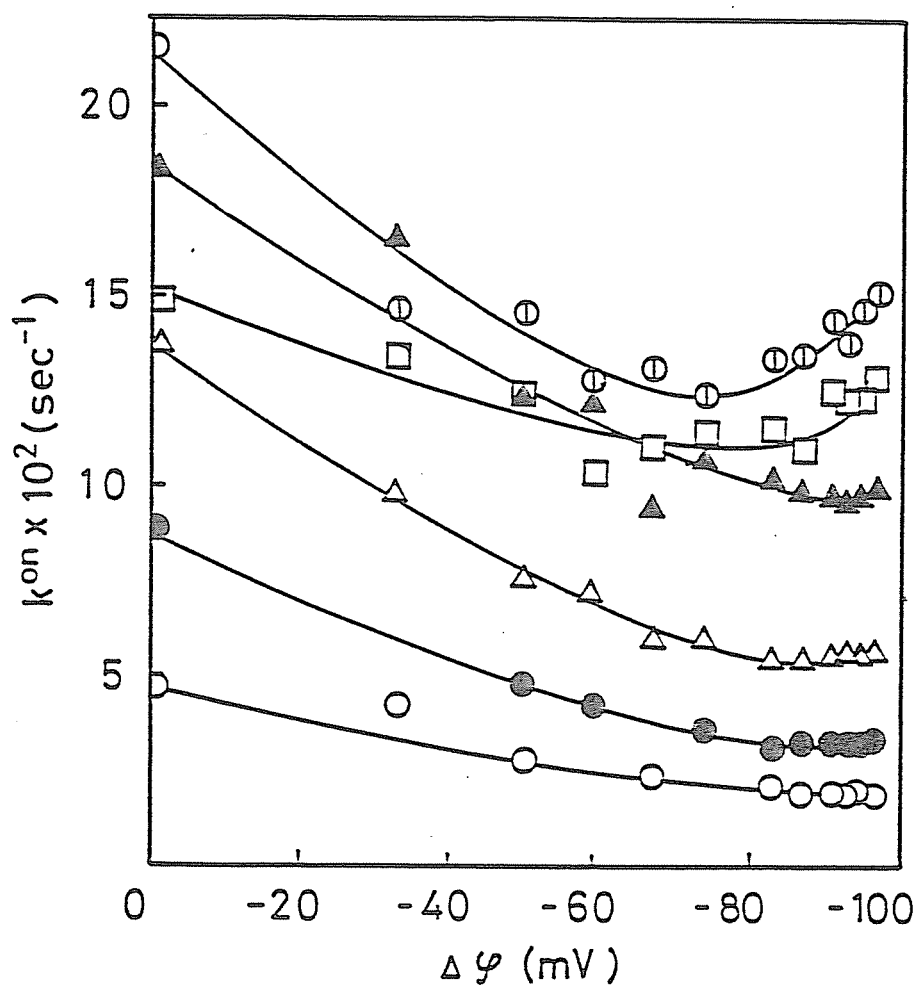


図6-5 速度定数 k_{on} の膜電位依存性

プローブ初濃度は $2 \mu M$ 。膜電位は第4章、4-16式を用い、 $f=0.85$ として計算した。 $\Delta\psi=0$ での速度定数は図6-7に示した各プローブごとの k_{off} の平均値をプロットした。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙ TPP⁺

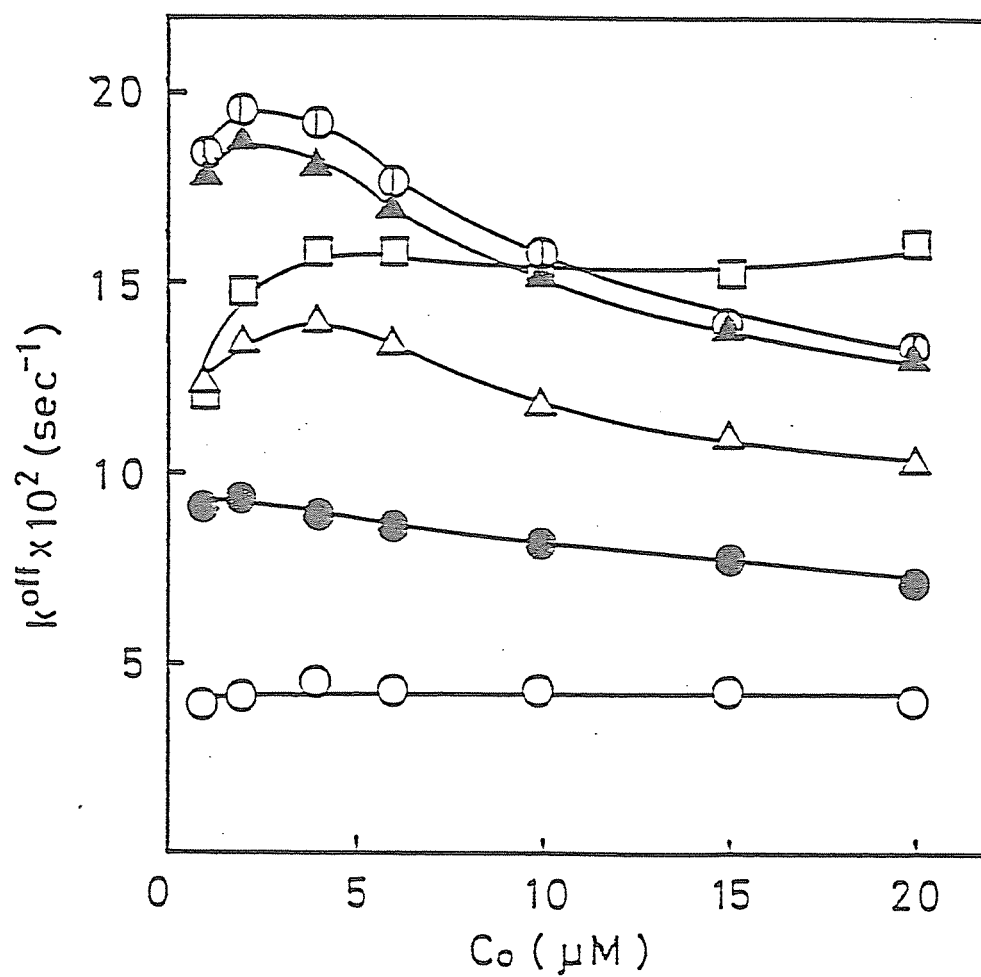


図6-6 速度定数 k^{off} へのプローブ濃度 C_0 の効果

k^{off} は6-1 式で解析した。測定条件は図6-2 と同じである。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙, TPP⁺

6-7 に k^{of} と膜電位の関係を示す。ここでの膜電位は光消去前に発生していた値である。どのプローブでも k^{of} は光消去前の膜電位には依存しない。この原因は光消去後には膜電位は発生していないためと考えられる。言い換えれば、off kinetic におけるプローブ透過（排出）の駆動力はベシクル内外の濃度差だけである。しかも、 k^{of} が濃度差に無関係に一定であることは、反応次数が一次であることを裏づける。また k^{on} に比べ k^{of} の方が大きいことが注目される。

6-1式で定義される一次反応速度定数をon kineticとoff kinetic について測定した。 k^{of} はプローブ濃度勾配にかかわらず一定である。一方、 k^{on} は膜電位に依存する。 k^{on} を膜電位に対してプロットすると極小を示す。プローブとりこみの駆動力が膜電位であるなら、膜電位を大きくするに従って k^{on} が大きくなることは理解できる。しかし膜電位が小さい領域では逆の傾向が観測される。この現象はつぎのように説明することができる。光を照射したとき、膜を透過するプローブの流束 J^{on} はelectrochemical activity に比例すると考えてよい[5,15]。

$$J^{on} = P^{on} [C_o - C_i \exp(F \Delta \psi / RT)] \quad (6-3)$$

ここで P^{on} , C_o , C_i , $\Delta \psi$ はそれぞれ透過係数、外液のプローブ濃度、内液のプローブ濃度、外液を基準とした膜電位である。 R , T , F は気体定数、絶対温度、ファラデー定数である。膜への吸着を考えない[5,16] とき、膜電位によるとりこみは

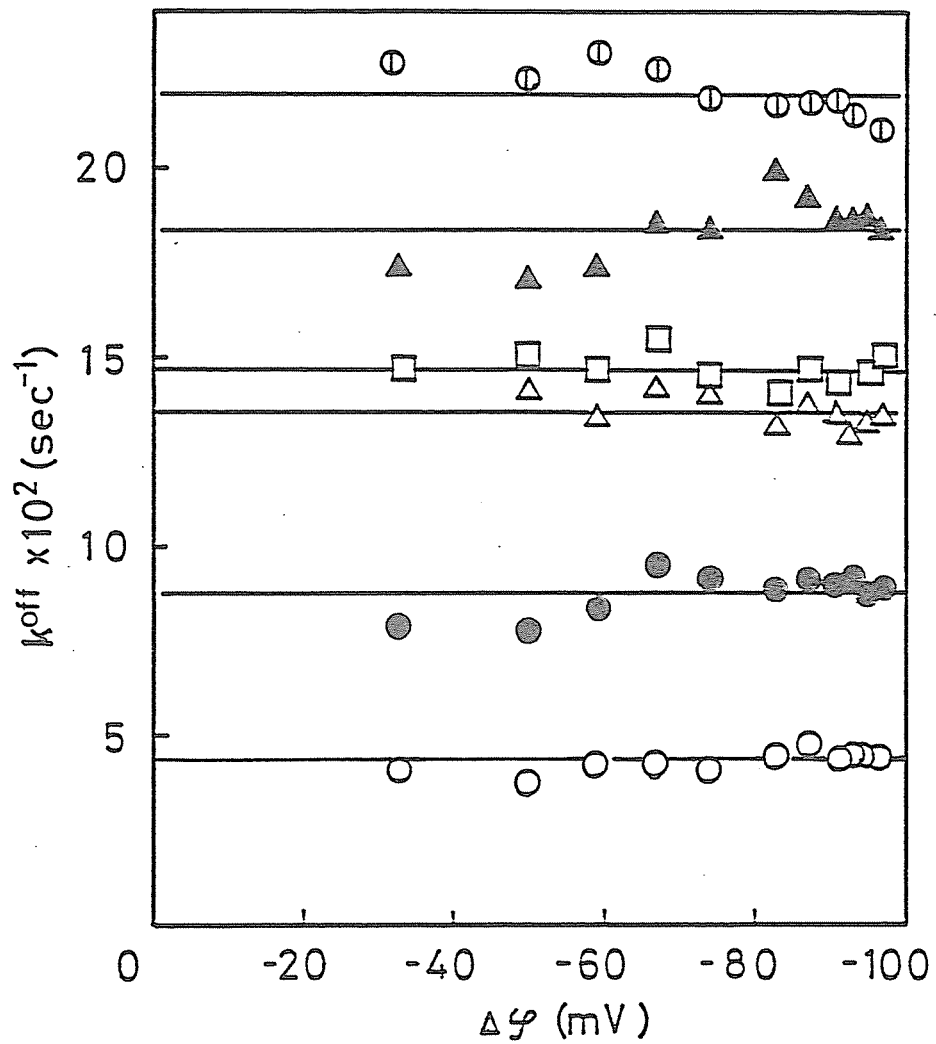


図6-7 速度定数 k^{off} の膜電位依存性

膜電位は光消去前に発生していた値である。測定条件は図6-5と同じである。

$\circ$, TPMP⁺ ; $\bullet$, TPEP⁺ ; $\triangle$, TPPP⁺ ; $\blacktriangle$, TPBP⁺ ; $\square$, TPAP⁺ ; $\bigcirc$, TPP⁺

$$-\ln[(U_e - U(t))/U_e] = \alpha P^{on} [V_i/V_o + \exp(F\Delta\psi/RT)] t \quad (6-4)$$

で示される。ここで α はベシクルの表面積と V_i に関する比例定数である。 V_i, V_o はベシクル内、外の体積である。6-1 式で定義した速度定数は次式に比例する。

$$k^{on} = \alpha P^{on} [V_i/V_o + \exp(F\Delta\psi/RT)] \quad (6-5)$$

$\exp(F\Delta\psi/RT)$ は過分極（ベシクル内負の膜電位の絶対値が増加）すると減少する。たとえば膜電位が 0 から -120mV まで変わると、 $\exp(F\Delta\psi/RT)$ は 1から0.01に減少する（一方、 V_i/V_o は通常の条件(1mg protein/ml)で0.003 であり、この変化に比べ小さい）。従って上の説明で図6-5 にみられた膜電位の絶対値増加による k^{on} の減少は理解できる。しかしながら-80 ~ -90 mV 以上で k^{on} が増加した結果の説明はこれだけでは不十分である。ここで P^{on} が膜電位（絶対値）増加にともなって大きくなることが推察される（以下参照）。

6-1 式で定義した k^{off} は6-5 式と同様の取り扱いから次式と比例する。

$$k^{off} = \alpha P^{off} [V_i/V_o + 1] \quad (6-6)$$

ここで光消去後の測定の間、膜電位は発生していないと仮定した。図6-7 で k^{off} は膜電位によらず一定であることを示した。6-6 式に従うと、この実験系では P^{off} はプローブ濃度勾配に依存しないこと

を意味する。 $k^{on}, k^{off}, V_i, V_o, \Delta\psi$ はわかっているので、 k^{on} と k^{off} の比から P^{on} の P^{off} に対する比が計算できる。 P^{on}/P^{off} を膜電位の関数としてプロットした(図6-8)。 P^{on} は膜電位に従って増加し、 $\Delta\psi = -100$ mV で50倍前後大きくなる。 $\ln(P^{on}/P^{off})$ を膜電位に対してプロットすると、図6-9のように直線が得られる。内部負の膜電位が増加するに従って P^{on} が指数的に大きくなることを示している。さらにプローブの脂溶性が異なっても透過係数の膜電位依存性はほぼ同じであると考えられる。しかしながら図6-8では脂溶性の高いプローブほど若干 P^{on}/P^{off} が大きい。6-5, 6-6式の取り扱いが透過係数への吸着の寄与を考慮しなかった。このためプローブ間の違いが現れたと考えられるが詳細についてはさらに検討が必要である。前に述べたように、6-5式の右辺第二項は膜電位増加で減少する。そのためon kineticの速度定数 k^{on} は P^{on} に比べてそれほど大きくならないと考えられる[18]。

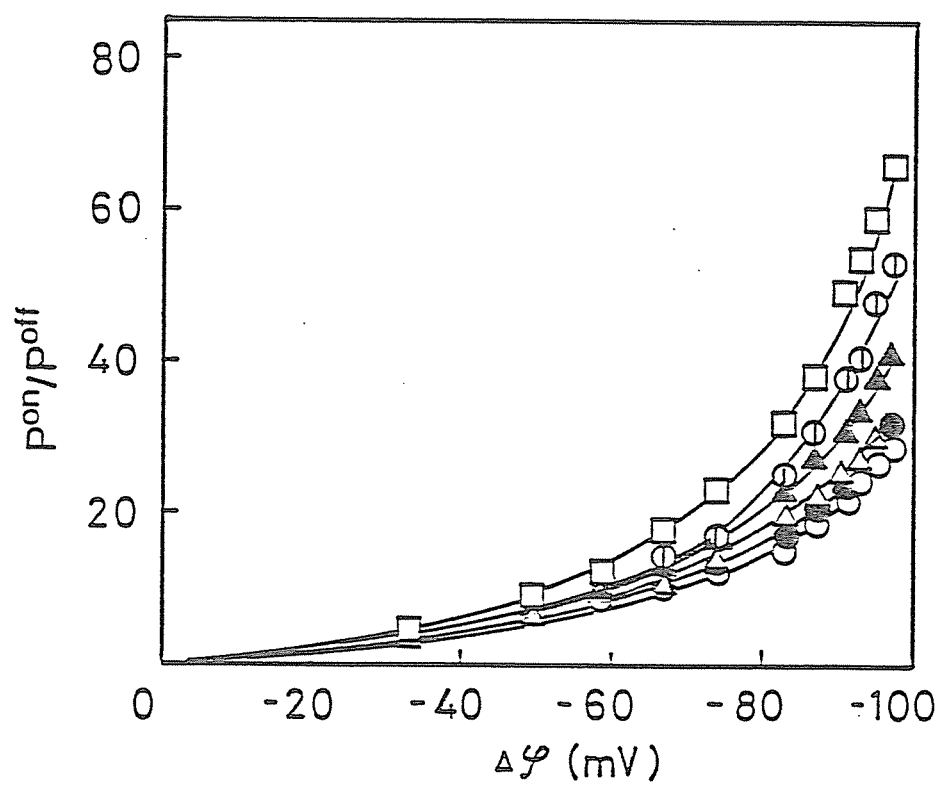


図6-8 P_{on}/P_{off} 対 $\Delta\psi$ プロット

P_{on}/P_{off} は6-5, 6-6式の比から計算した。測定条件は図6-2 と同じである。

○, TPMP⁺ ; ●, TPEP⁺ ; △, TPPP⁺ ; ▲, TPBP⁺ ; □, TPAP⁺ ; ⊙ TPP⁺

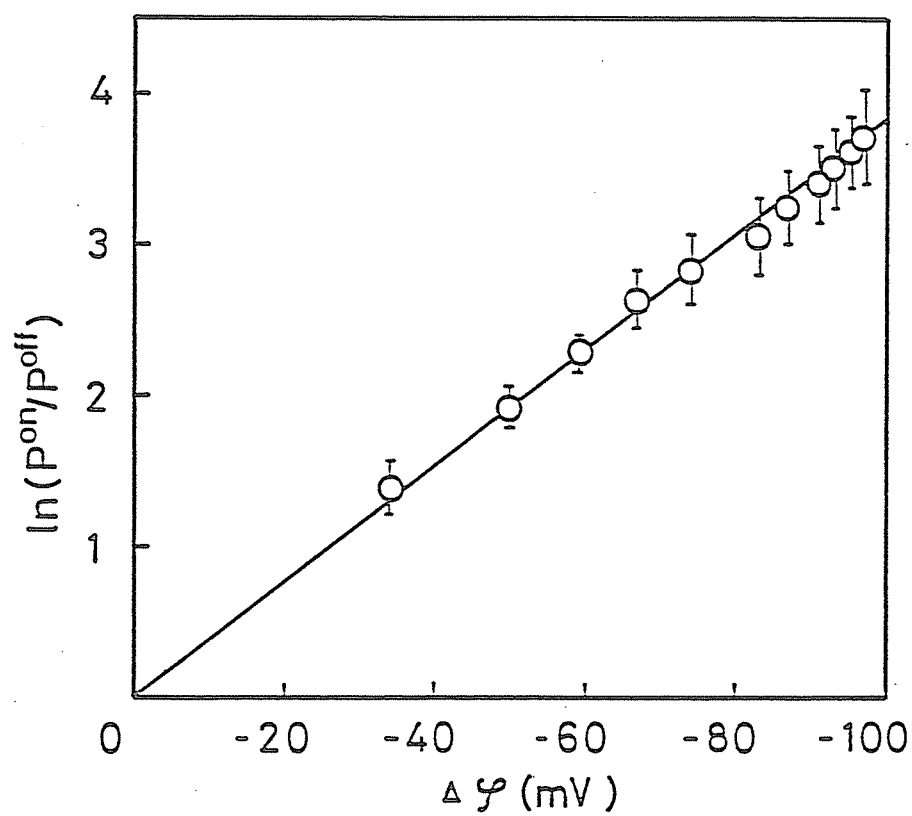


図6-9 $\ln(P_{on}/P_{off})$ 対 $\Delta\psi$ プロット

図6-8の縦軸を対数に書き換えた。プロットの縦線は6種類のプローブの標準偏差である。

6-4 まとめ

高度好塩菌膜の脂溶性イオン透過速度の測定を行なった。高度好塩菌膜には光駆動性のイオンポンプ（ハロロドブシン）が含まれている。この実験材料はプローブ透過の速度を解析する目的に適している。

脂溶性の異なるホスフォニウムイオンの同族体を用いて光照射、消去に伴うとりこみ速度を解析した。とりこみ速度は吸着量と同様に、プローブの脂溶性が高いものほど大きい。膜電位存在下のとりこみ速度 k^{on} は -80 mV から -90 mV で極小値をとる。一方、光消去後の排出速度 k^{off} は光消去以前の濃度差に依存しないことが明らかとなった。

とりこみ速度の比較から透過係数の膜電位依存性を解析した結果、プローブの透過係数は膜電位に対して、指数的に増加することが示唆された。とりこみ速度の取り扱いでは透過係数への吸着の寄与を考慮しなかったが、他の方法との比較など、詳細についてはさらに検討が必要である。

膜電位プローブとして 'よい' 条件は緒言で述べたように

(1) 膜あるいは細胞内器官に吸着せず、(2) 膜透過が速いことである。しかしながら(1), (2) は相反する条件であり、吸着の問題は免れない。吸着量の補正は、第4章の方法で行える。また脂溶性イオンの膜電位応答時間はプローブで異なるが、高度好塩菌膜の場合、平衡値に達するまでに TPP^+ で1分以内、 $TPMP^+$ で2, 3分であった。極短時間の応答を重視しない場合、脂溶性イオン選択性電極は膜電位の経時変化を観測する目的には非常に優れた方法である。

引用文献

- 1 Grinius, L.L., Jasaitis, A.A., Kadziaaskas, Yu.P., Liberman, E. A., Skulachev, V.P., Topali, V.P., Tsofina, L.M. and Vladoimirava, M.A. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 1-12
- 2 Harold, F.M. and Papineau, D. (1972) *J. Membrane Biol.* 8, 27-44
- 3 Ramos, S., Schuldiner, S. and Kaback, H.R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1892-1896
- 4 Rottenberg, H. (1975) *Bioenerg.* 7, 61-74
- 5 Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. and Kobatake, Y. (1979) *J. Membrane Biol.* 49, 105-121
- 6 Demura, M., Kamo, N. and Kobatake, Y. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812, 377-386
- 7 Stoeckenius, W. and Bogomolni, R.A. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 587-616
- 8 Hazemoto, N., Kamo, N., Kobatake, Y., Tsuda, M. and Terayama, Y. (1984) *Biophys. J.* 45, 1073-1077
- 9 Lanyi, J.K. and MacDonald, R.E. (1979) *Methods Enzymol.* 56, 398-407
- 10 Kuroki, M., Kamo, N., Kobatake, Y., Okimasu, E. and Utsumi, K. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 693, 326-334
- 11 Kamo, N., Racanelli, T. and Packer, L. (1982) *Methods Enzymol.* 88, 356-360
- 12 Muratsugu, M., Kamo, N., Kobatake, Y. and Kimura, K. (1979)

- Bioelectrochem.Bioenerg. 6,477-491
- 13 Kamo,N.(1982) Seibitsu Butsuri 22,59-69
 - 14 Kamo,N.,Takeuchi,M.,Hazemoto,N. and Kobatake,Y.(1983)
Archiv.Biochem.Biophys. 221,514-525
 - 15 Johnson,F.M.,Eyring,H. and Polissar,M.J.(1954)"Kinetic
Basis of Molecular Biology",p545 John Wiley and Sons,
New York
 - 16 Muratsugu,M.,Kamo,N.,Kobatake,Y. and Suda,Y.(1979)
Membrane 4,323-330
 - 17 Demura,M.,Kamo,N. and Kobatake,Y.(1985) Biochim.Biophys.
Acta 820,207-215
 - 18 Damura,M.,Kamo.,N. and Kobatake,Y.(1985) Bioelectrochem.
Bioenerg.14,in press.

バクテリアやオルガネラなどの小胞の膜電位を微小電極で直接測定することは、一般に困難であるので、プローブを導入して間接的に推定する方法が適用されている。脂溶性イオンはプローブのひとつであり、膜電位測定原理が明確であるという利点があるため、これまで多くの小胞に対して適用されてきた。しかしながら脂溶性イオンを用いる方法は、定量性が劣るという問題点があった。この原因は脂溶性イオンが膜に吸着するためである。これまで、吸着補正の方法が確立されていなかった。そこで本研究では脂溶性イオンを用いたバクテリアやオルガネラなどの小胞の膜電位測定法の確立を目的として、生体膜への脂溶性イオンの吸着現象を解析した。脂溶性イオンは tetraphenyl phosphonium (TPP^+)と triphenylmethyl phosphonium(TPMP^+)の同族体、およびスピラベルした脂溶性ホスフォニウムイオンを用いた。 TPP^+ と TPMP^+ の同族体の吸着は脂溶性イオン選択性電極で、またスピンプローブはESRで吸着を測定した。その結果、以下に述べる事が明らかとなった。

1. リボソーム、高度好塩菌膜ベシクル、ミトコンドリアへの脂溶性イオンの吸着はLangmuir型の吸着式に従う。吸着量は高度好塩菌膜ベシクルの場合が最も多い。これは mediumが高イオン強度(4M NaCl)であるために、脂溶性イオンのmediumへの溶解度が低いことによる。また吸着量の多いプローブは高親和性と低親和性の吸着サイトの存在を示唆した。

2. スピンラベルした脂溶性イオンの吸着に伴う熱力学量を測定した。吸着の自由エネルギー変化, ΔG はエンタルピー変化, ΔH がほぼゼロであり、エントロピー変化, ΔS が支配的である。すなわち吸着力は疎水性効果の寄与が大部分を占めることが明らかとなった。
3. 脂溶性イオンの吸着サイトをスピンスピン交換相互作用から推定した。プローブ分子は脂質二分子膜の表面付近に吸着していることが示唆された。また膜の両界面への吸着は吸着速度式の解析から、それぞれの膜表面と接する水相のプローブ濃度のみの関数で表されることを示した。
4. 脂質のゲル状態から液晶状態への相転移において、吸着量が著しく増加した。この現象は吸着サイトの増加に関係すると考えられる。
5. 高度好塩菌膜ベシクルの光誘起膜電位を脂溶性イオンとりこみから推定した。吸着補正しない膜電位は、同一条件で測定したにもかかわらず、プローブの脂溶性が高いほど大きな値となった。この原因はとりこみ量の中に吸着量が含まれているためである。真の膜電位を計算するには吸着量を差し引かなければならない。この吸着量は3.に述べたように膜の両側の濃度に依存する。すなわち膜の両側でプローブ濃度差がある場合の吸着機構から、補正量を見積ることが必要である。本研究では脂溶性の異なる一連の同族体を使用した。これらのプローブで推定した膜電位の間には規則性がある。それは上述したように、プローブの脂溶性が高いほど、過大評価となることである。言い換えれば、脂溶性が低く吸着しない仮想的なプローブがあると、正確な膜電位が求められることを表す。プローブの脂溶性（吸着のしやすさ）と膜電位によるとりこみ量の関係は次

式で示すことができる。

$$U/(C_o V_i) = C_i^{app}/C_o = [f + (1-f)C_i/C_o] K_b/V_i + C_i/C_o$$

ここでUはとりこみ量、 C_i, C_o は膜内外のプロープ濃度、 V_i は内部体積、 K_b は吸着係数、 f は K_b のうちの膜外部相の割合を表すパラメータである。 C_i^{app} はとりこみ量を吸着補正しないで算出したみかけの内部プロープ濃度である。従って C_i^{app}/C_o を K_b に対してプロットし、縦軸へ外挿した値が膜電位によって内外に分布した真の濃度比 C_i/C_o である。上式と $\Delta\psi = (RT/F)\ln(C_o/C_i)$ から次式を得る。

$$\Delta\psi = (-RT/F)\ln[(U/C_o - fK_b)/(V_i + (1-f)K_b)]$$

測定系の V_i, K_b, f を予め求めておけば、実測値 U, C_o からプロープ吸着を補正した膜電位が計算できる。この計算式を高度好塩菌膜ベシクル、ミトコンドリアに適用した結果、同一条件で求めた膜電位はプロープの種類に依存しない同じ膜電位が得られた。この式は膜電位を求める実験式として有効であると考えられる。 f 値はサンプルの膜構造に依存する。事実、高度好塩菌膜ベシクルとミトコンドリアでは異なる値が得られた。第4, 5章では f 値を数種類の方法で決定した。この膜電位計算式をより使いやすくするための課題は、 f 値の簡易的決定法である。脂溶性イオン選択性電極には、プロープ濃度を連続的に測定できる利点があるため、プロープとりこみ速度の測定が可能である。この方法で、吸着を考慮した透過機構が明らかにできれば、 f 値に関する知見が得られると考えられる。

付 録

測定および解析のコンピュータプログラム

機種：NEC PC-9801

A/Dconverter:AD-5312(A&D Electric Co).

言語：N88-BASIC

A. 電極電位測定

[ADC X5] 1

B. 非線形最小二乗法

[NON-E1] 5

[SX1007] 27

C. 反復法

[B-f&n1111] 19

D. 一次反応速度定数の解析

[K 33A] 21

[K FPF4] 25

[SX1007] 27

```

1000 'save "ADC X5",A
1010 '***** ADC X5*****('85/08/21) for mitochondria *****
*****
1020 WIDTH 80,20:CONSOLE 0,25,0,0:DIM P(4500),A$(15),C$(4,15),C(4
,15):GOSUB *S
1030 FOR I=1 TO 12:READ A$(I):PRINT A$(I):NEXT:GOSUB *B:PRINT:PRI
NT
1040 INPUT "OK? HIT RET",A
1042 CLS:PRINT "RELATIVE POTENTIAL COEFFICIENT (RPC)"
1044 PRINT:PRINT" RPC = deltaE(25)/deltaEO(25)=X/17.808"
1046 PRINT:PRINT:INPUT "RPC =[1.0000]";RPC:IF RPC=0 THEN RPC=1
1048 CLS:FOR I=1 TO 4:READ A$(I):PRINT A$(I):NEXT
1050 GOSUB *B:LOCATE 22,6:PRINT "SELECT No.";X$=INPUT$(1):PRINT
X$;
1060 IF X$="1" THEN INPUT " CH ";CH :LOCATE 50,6:PRINT "CH";CH
;" OK?"
1070 CN=VAL(X$):IF CN<1 OR CN>4 GOTO 1050
1080 LOCATE ,8 :INPUT "ELECTRODE POTENTIAL RANGE( mV ) = [20]";YR

1090 IF YR=0 THEN YR=20:LOCATE 34,8:PRINT " 20 "
1100 PRINT "SAMPLING TIME (";CN;"=< ? =< 1000 sec/point) ";;INPUT
;ST
1110 IF ST=0 OR ST<CN THEN LOCATE ,9:GOTO 1100
1120 INPUT "NUMBER OF DATA POINTS FOR AVERAGE=[4]";N
1130 IF N=0 THEN N=4:LOCATE 34,10:PRINT " 4 "
1140 PRINT:FOR I=1 TO 4:READ A$(I):PRINT A$(I):NEXT
1150 PRINT:INPUT "ONLINE OK?.....[RET] Key",A :CLS
1160 '=====
=====
1170 FOR I=1 TO 15:READ A$(I):NEXT :GOTO *SAMPLE
1180 GOSUB *B:PRINT:INPUT "1. SAMPLE CONDITION 2. BASELINE CH
ECK ";A
1190 ON A GOTO *SAMPLE,*BASE :GOTO 1180
1200 *SAMPLE :WIDTH 80,20
1210 FOR I=1 TO CN :CLS:PRINT "CHANNEL ";I-1:PRINT
1220 FOR J=1 TO 12:PRINT A$(J);C$(I,J):NEXT:GOSUB *B
1230 FOR J=2 TO 12:LOCATE 37,J+1:LINE INPUT "",Z$ :IF Z$<>"" THEN
C$(I,J)=Z$
1240 NEXT J:NEXT I :CLS
1250 FOR I=1 TO CN:LOCATE 20*(I-1),1:PRINT "CHANNEL ";I-1:NEXT:FO
R J=1 TO 12
1260 FOR I=1 TO CN:LOCATE 20*(I-1),J+1:PRINT C$(I,J):NEXT:NEXT:GO
TO 1180
1265 *BASE:IF C$(1,5)=FF$ THEN PRINT" CHANGE FILE No. !":GOTO
1180
1270 PRINT:PRINT"START OK?.....[SPACE]key";X$=INPUT$(1) :B
=1
1280 *GRAPH : '=====
=====
1290 OPEN "COM:083NN" AS #1: GOSUB *S :WIDTH 80,25 : XAXIS=2

```

```

1300 FOR S=0 TO 2:SCREEN ,,S:LINE(34,0)-(34,320),,BF:LINE(34,320)
-(634,320),,BF
1310 FOR I=0 TO 9:LINE(32,320/10*I)-(36,320/10*I):NEXT I
1320 FOR I=1 TO 10:LINE(34+(634-34)/10*I,318)-(34+(634-34)/10*I,3
22):NEXT I
1330 LINE(40,352)-(116,368),,B :NEXT S
1340 LOCATE 0,0:PRINT-YR:PRINT "E/mV":LOCATE 35,21:PRINT "TIME/mi
n."
1350 IF B=1 THEN FOR I=0 TO CN-1:LOCATE 0,16-4*I:PRINT "CH";I:NEX
T:LOCATE 20,1:PRINT "CHECK BASELINE.          OK? [SPACE]KEY"
1360 FOR I=0 TO 78 STEP 15:LOCATE I,20:PRINT USING "####";ST*2*I
/15/XAXIS:NEXT
1370 LOCATE 50,21:PRINT "SAMPLING TIME";ST;"sec":LOCATE 5,23
1380 PRINT"PAGE:[0]CH0  [1]CH1  [2]CH2&CH3  [3]ALL.          [SPACE
]NEXT JOB"
1390 TIME$="00:00:00":LOCATE 6,22:PRINT TIME$ :'======
=====
1400 FOR I=1 TO CN
1410 IF I>1 THEN PRINT #1,"SET"+STR$(I):FOR J=0 TO 1000:NEXT
1420 PRINT #1,"DTIN":INPUT #1,P(I):IF I>2 OR CH>1 THEN P(I)=P(I)/
10
1430 NEXT :I=1
1440 T=3600*VAL(LEFT$(TIME$,2))+60*VAL(MID$(TIME$,4,2))+VAL(RIGHT
$(TIME$,2))
1450 X$=INKEY$:IF INP(&HE0)=254 OR X$="1" OR X$="2" OR X$="3" THE
N SCREEN ,,1+VAL(X$)*(1+VAL(X$))/2
1460 ON -(INP(&HE9)=191) GOTO *AA :IF I=T/ST THEN 1470 ELSE 1440
1470 FOR K=1 TO CN :M=K+I*CN
1480 IF CN>1 THEN PRINT #1,"SET"+STR$(K) :FOR J=0 TO 999:NEXT
1490 PRINT #1,"DTIN":INPUT #1,P(M) :IF K>2 OR CH>1 THEN P(
M)=P(M)/10
1500 X=34+I*XAXIS: Y=320+(P(M)-P(K))/YR*320000!-64*K*B
1510 IF X>634 THEN X=X-600 ELSE IF Y<0 THEN Y=Y+320 ELSE IF Y>320
THEN Y=Y-320
1520 IF X>634 OR Y<0 OR Y>320 THEN GOTO 1510
1530 SCREEN ,,(K-1)^.7:PSET(X,Y):LOCATE 6,22:PRINT TIME$ :LOCATE
16,22:PRINT USING "CH##:#####.###mV";K-1,P(M)*1000
1540 NEXT K: I=I+1: GOTO 1440
1550 '======
=====
1560 *AA: IF CN<>1 THEN PRINT #1,"SET 1"
1570 GOSUB *B:FOR J=1 TO 400:X$=INKEY$:NEXT :CLOSE #1 :DN=I-1
1580 LOCATE 20,10:INPUT "1.DATA INPUT          2.DATA FILE          ";A
1590 IF A=1 THEN B=0:GOTO *GRAPH ELSE IF A=2 GOTO *DFILE ELSE 158
0
1600 *DFILE :'======
=====
1610 GOSUB *CALCU
1612 A=DSKF(2):PRINT "          data memory=";A:IF A<5 THEN GOSUB *B:B
EEP:FILES 2

```

```

1614 INPUT "      RET",A
1620 CLS:FOR I=1 TO CN:PRINT "      FILE No. ";C$(I,5)
1630 IF C$(I,5)="" THEN BEEP:PRINT " NOT DEFINED FILE No.? ":GOTO
1580
1640 OPEN "2:"+C$(I,5) FOR OUTPUT AS #1
1650 FOR J=2 TO 12 :PRINT #1,C$(I,J) :NEXT:PRINT #1,CN,YR,ST,DN
,N
1660 FOR M=0 TO DN :PRINT #1,P(I+M*CN) :NEXT:CLOSE #1 :NEXT :FF$=
C$(1,5)
1670 PRINT:PRINT "      DATA FILED.      RESTART?      [SPACE]KEY"
;:X$=INPUT$(1)
1680 GOSUB *S:GOTO *SAMPLE
1690 *CALCU : '=====
=====
1700 CLS: R=8.314:F=96484.6
1710 FOR I=1 TO CN:FOR J=7 TO 12:C(I,J)=VAL(C$(I,J)):NEXT:NEXT
1720      FOR I=1 TO CN
1730 E1=0:FOR M=1      TO N :E1=E1+P(I+M*CN):NEXT:E1=E1/N
1740 E2=0:FOR M=DN-N+1 TO DN:E2=E2+P(I+M*CN):NEXT:E2=E2/N      :E(I
)=E2-E1
1750 C1=C(I,7):V1=C(I,8)/1000:C2=C(I,9)*1000:V2=C(I,10)/1E+06:VI=
C(I,11)/1E+06
1760 VES=C2*V2:CVES=VES/(V1+V2):T=273.15+C(I,12):EA=E(I)+R*T/F*RP
C*LOG((V1+V2)/V1)
1770 C3=C1*EXP(EA*F/R/T/RPC):UE=(C1*V1-C3*V1)/VES      :CICO=UE/VI/
C3
1780 LPRINT "=====FILE No.";C$(I,5);"=====
1790 LPRINT USING "&      &##.##°C";C
$(I,6),C(I,12)
1800 LPRINT USING A$(13);C(I,7),C(I,8),C(I,9),C(I,10),C(I,11):LPR
INT A$(14)
1810 LPRINT USING A$(15);E(I)*1000,EA*1000,C3,CVES/1000,UE,CICO :
LPRINT
1820      NEXT :LPRINT:RETURN
1830 *S:CLS:FOR I=0 TO 2:SCREEN 2,0,I:SCREEN,3:ROLL 399:ROLL 1:SC
REEN,0:NEXT:RETURN
1840 *B:FOR F=0 TO 1:BEEP 1:FOR G=0 TO 70:NEXT G:BEEP 0:FOR G=0 T
O 70:NEXT G:NEXT F :RETURN
1850 END: '=====
=====
1860 DATA "PROGRAM OF ELECTRODE POTENTIAL MEASUREMENT WITH FOUR C
HANNEL A/D CONVERTER",""
1870 DATA "1. The uptake of lipophilic ions by vesicles etc. are
measured by means of an      electrode selective respective ions.
"
1880 DATA "2. The potential difference between the selective ele
ctrode and the reference      electrode is measured with an electr
ometer(output;normal or tenfold)."
```

1890 DATA "3. With this program the signal is stored in this com
puter through an A/D converter."

```

1900 DATA "4. Set the disket for data stock on drive-2." ,""
1910 DATA "==== A/D CONVERTER ( CH0, CH1, CH2, CH3 ) ====="
1920 DATA "CH0 : ELECTROMETER (NORMAL OUTPUT)"
1930 DATA "CH1 : ELECTROMETER (NORMAL OUTPUT)"
1940 DATA "CH2 : ELECTROMETER (TEN-FOLD OUTPUT)"
1950 DATA "CH3 : ELECTROMETER (TEN-FOLD OUTPUT)"
1960 DATA "1. CH0 or CH1 or CH2 or CH3", "2. CH0,CH1", "3. CH0,C
H1,CH2", "4. CH0,CH1,CH2,CH3"
1970 DATA "SET MULTI LOGGING METER(AD-5312).", " FUNCTION--
----[DCV]", " RANGE-----[AUTO], [HI SAMPL]", " GROU
P SELECT--[CH0]"
1980 DATA "===== SAMPLE CONDITION ===== "
1990 DATA "Date --/--/-- "
2000 DATA "Channel No. - "
2010 DATA "Exp. No. -- "
2020 DATA "File No. ----- "
2030 DATA "Comment "
2040 DATA "Concn.( initial probe ) /mol/l "
2050 DATA "Volume( initial probe soln.) /ml "
2060 DATA "Concn.( stock vesicle susp.) /mg/ml "
2070 DATA "Volume( added vesicle susp.) /ul "
2080 DATA "Volume( intra vesicle ) /ul/mg "
2090 DATA "Temp. /°C "
2100 DATA "PROBE SOLN###.##^mol/l,##.##ml. VESI SUSP###.##mg/ml,
###.##ul,##.##ul/mg"
2110 DATA " Emeas/mV Eup/mV Co/mol/l Cves/mg/ml Ue/mol/
mg Ciapp/Co"
2120 DATA "###.### ###.### ###.###^ ^ ^ ^ ^ ^ ^ ^
^ ^ ###.###"
2130 '=====
=====

```

```

1 'save "NON-E1"
100 REM NON-LINEAR LEAST SQUARE ANALYSIS PROGRAM (Km DETERMINATIO
N)
110 REM WITTEN BY BILL FINKENSTADT 03/02/77
120 REM REVISED FOR NEC PC-9801F-2 BY MISAO TASHRO & KIMIKAZU HAS
HINO
130 WIDTH 80,25:CONSOLE 0,25,0,0:SCREEN 2
140 CLEAR
150 M9=20
160 F3=0
170 N9=9
180 N0=1
190 N2=1
200 N=100
210 DIM X1(100),Y1(100),A7(10,10),A9(10,10),D9(10),I9(10),J9(10)
220 DIM X2(4),A(10),F9(11),I8(10),L9(6),B9(10)
230 DIM A1$(10)
240 FOR I=1 TO N9
250 A(I)=0
260 I8(I)=0
270 F9(I)=0
280 NEXT I
290 F9(10)=0
300 L9(2)=.001
310 CLS :ROLL 399:ROLL 1
320 PRINT "NON-LINEAR LEAST SQUARE ANALYSIS ( Km CALCULATION )"
330 PRINT
340 L9(3)=.001
350 PRINT "CURRENT MAXIMUMS: NUMBER OF PARAMETERS"; N9
360 PRINT "          NUMBER OF POINTS "; N
370 PRINT "          NUMBER OF ITERATIONS"; M9
380 PRINT "CONVERGENCE CRITERION DELTA "; L9(2)
390 PRINT "          EPSILON "; L9(3)
400 PRINT "AVAILABLE FUNCTIONS ARE : "
410 PRINT "  1. Simple Michaelis Menten"
420 PRINT "  2. Two Enzyme Variation of Michaelis Menten"
430 PRINT
440 PRINT "REQUESTED FUNCTION NUMBER IS ";
450 INPUT F9(1)
460 PRINT
470 F9(1)=INT(F9(1))
480 PRINT "ENTER TITLE : ";
490 INPUT D$
500 IF LEN(D$)<=0 THEN 520
510 T$=D$
520 IF F9(1)<1 OR F9(1)>2 THEN 540
530 GOTO 560
540 PRINT "YOU HAVE MADE A TYPING ERROR!!  TRY AGAIN !!!"
550 GOTO 440
560 L=F9(1)

```

```

570 ON L GOTO 580,660
580 REM SIMPLE M-M=====
=====
590 N9=2
600 H$="[S]"
610 V$="Velocity"
620 B$="[S] and Velocity"
630 A$(1)="V(max)           :"
640 A$(2)="Km               :"
650 GOTO 750
660 REM TWO ENZYME VARIATION=====
=====
670 N9=4
680 H$="[S]"
690 V$="Velocity"
700 B$="[S] and Velocity"
710 A$(1)="V(max)[1]       :"
720 A$(2)="Km[1]           :"
730 A$(3)="V(max)[2]       :"
740 A$(4)="Km[2]           :"
750 REM INPUT DATA =====
=====
760 IF F9(9)=1 THEN 950
770 IF F3=1 THEN 950
780 PRINT
790 PRINT "IS THE DATA ON DISK";
800 INPUT D$
810 IF D$="N" THEN 840
820 GOSUB 3120
830 GOTO 950
840 PRINT
850 PRINT "NUMBER OF DATA POINTS";
860 INPUT N1
870 PRINT
880 PRINT B$
890 PRINT
900 FOR I=1 TO N1
910 PRINT I;
920 INPUT X1(I),Y1(I)
930 NEXT I
940 PRINT
950 PRINT "ENTER PARAMETER GUESSES : "
960 F9(9)=0
970 FOR J=1 TO N9
980 PRINT A$(J);
990 INPUT A(J)
1000 PRINT "TYPE Y/N TO FIX THIS PARAMETER";
1010 INPUT D$
1020 I8(J)=0
1030 IF D$="N" THEN 1050

```

```

1040 I8(J)=1
1050 NEXT J
1060 PRINT
1070 PRINT "          ANSWER      Y/N"
1080 PRINT
1090 PRINT "1. DO YOU WANT TO LIST/EDIT THE DATA";
1100 INPUT D$
1110 IF D$="N" THEN 1130
1120 GOSUB 1740
1130 GOSUB 1570
1140 PRINT "2. DO YOU WANT TO STORE THE DATA ON DISK";
1150 INPUT D$
1160 IF D$="N" THEN 1180
1170 GOSUB 3010
1180 PRINT "3. DO YOU WANT TO EXCUTE THE FIT";
1190 INPUT D$
1200 IF D$="N" THEN 1430
1210 GOSUB 3230
1220 LOCATE 0,24:PRINT "RETURN KEY!!";
1230 INPUT D$
1240 IF LEN(D$)=0 THEN 1260
1250 GOTO 1220
1260 CLS :ROLL 399:ROLL 1
1270 PRINT "1. LIST THE DATA"
1280 PRINT "2. LIST THE RESULT"
1290 PRINT "3. PLOT THE RESULT"
1300 PRINT "4. RESTART THE PROGRAM"
1310 PRINT "5. END THE PROGRAM"
1320 PRINT
1330 PRINT "REQUESTED FUNCTION NUMBER IS";
1340 INPUT F0(1)
1350 F0(1)=INT(F0(1))
1360 Q=F0(1)
1370 IF Q=4 THEN 1460
1380 IF Q=5 THEN 1560
1390 ON Q GOSUB 2120,5640,6140
1400 IF F0(1)<1 OR F0(1)>5 THEN 1420
1410 GOTO 1220
1420 PRINT "YOU HAVE MADE A ERROR!!      TRY AGAIN!!" :GOTO 1330
1430 PRINT "DO YOU WANT TO RESTSRT THE PROGRAM";
1440 INPUT D$
1450 IF D$="N" THEN 1560
1460 PRINT "USE OLD DATA ";
1470 INPUT D$
1480 IF D$="N" THEN 140
1490 PRINT "USE DIFFERENT FUNCTION ";
1500 INPUT D$
1510 IF D$="N" THEN 1540
1520 F3=1
1530 GOTO 400

```

```

1540 PRINT "CORRENT PARAMETERS OR DATA ASUMMED "
1550 GOTO 1070
1560 CLS 3:END
1570 REM SUBROUTINE REORDER DATA FOR PRESENTATION ON CRT=====
=====
1580 N=N1
1590 M1=X1(N)
1600 FOR I=1 TO N
1610 IF M1>X1(I) THEN 1640
1620 M1=X1(I)
1630 M2=I
1640 NEXT I
1650 X1(M2)=X1(N)
1660 X1(N)=M1
1670 M1=Y1(M2)
1680 Y1(M2)=Y1(N)
1690 Y1(N)=M1
1700 N=N-1
1710 IF N=1 THEN 1730
1720 GOTO 1590
1730 RETURN
1740 REM SUBROUTINE LIST/EDIT=====
=====
1750 PRINT "LIST/EDIT SUBROUTINE ANSWER ALL QUESTIONS Y OR N"
1760 PRINT
1770 PRINT "DO YOU WANT TO SEE THE DATA";
1780 INPUT D$
1790 IF D$="N" THEN 1810
1800 GOSUB 2120
1810 PRINT "DO YOU WANT TO EDIT DATA";
1820 INPUT D$
1830 IF D$="N" THEN 2110
1840 PRINT "IS THE NUMBER OF DATA POINTS CORRECT";
1850 INPUT D$
1860 IF D$="Y" THEN 1880
1870 GOSUB 2340
1880 PRINT "DO YOU WANT TO SEE THE DATA AGAIN";
1890 INPUT D$
1900 IF D$="N" THEN 1920
1910 GOSUB 2120
1920 PRINT "ARE ALL OF THE DATA ENTRIES CORRECT";
1930 INPUT D$
1940 IF D$="Y" THEN 1960
1950 GOSUB 2570
1960 PRINT "DO YOU WANT TO SEE THE DATA AGAIN";
1970 INPUT D$
1980 IF D$="N" THEN 2000
1990 GOSUB 2120
2000 PRINT "ARE THE PARAMETERS.FIXED CHOICES CORRECT";
2010 INPUT D$

```

```

2020 IF D$="Y" THEN 2040
2030 GOSUB 2780
2040 PRINT "DO YOU WANT TO SEE THE DATA AGAIN";
2050 INPUT D$
2060 IF D$="N" THEN 2080
2070 GOSUB 2120
2080 PRINT "!!!LAST CHANGE TO MAKE CORRECTIONS!!! START EDIT AGAI
N";
2090 INPUT D$
2100 IF D$<>"N" THEN 1740
2110 RETURN
2120 REM SUBROUTINE LIST
2130 CLS 1
2140 GOSUB 1570
2150 PRINT "TITLE :";T$
2160 PRINT
2170 PRINT "          PARAMETER                      FIXED"
2180 FOR J=1 TO N9
2190 D$="NO"
2200 IF I8(J)=0 THEN 2220
2210 D$="YES"
2220 PRINT A1$(J);
2230 PRINT TAB(22);"";:PRINT USING"##.####^ ^^";A(J);:PRINT TAB(
40);D$
2240 NEXT J
2250 PRINT
2260 PRINT "          ";
2270 PRINT B$;
2280 PRINT
2290 FOR I=1 TO N1
2300 PRINT I;:PRINT TAB(15);"";:PRINT USING"##.####^ ^^";X1(I);
2310 PRINT TAB(31);"";:PRINT USING"##.####^ ^^";Y1(I)
2320 NEXT I
2330 RETURN
2340 REM SUBROUTINE CORRECT THE NUMBER OF DATA POINTS=====
=====
2350 PRINT "THE NUMBER OF DATA POINTS IS : ";N1
2360 PRINT "CHANGE THIS NUMBER TO : ";
2370 INPUT N2
2380 IF N2>N1 THEN 2490
2390 N3=N1-N2
2400 FOR J=1 TO N3
2410 PRINT "DELETE DATA POINT NUMBER ";
2420 INPUT N4
2430 FOR I=N4 TO N1-1
2440 X1(I)=X1(I+1)
2450 Y1(I)=Y1(I+1)
2460 NEXT I
2470 NEXT J
2480 GOTO 2550

```

```

2490 PRINT B$;
2500 PRINT
2510 FOR I=N1+1 TO N2
2520 PRINT I ;
2530 INPUT X1(I),Y1(I)
2540 NEXT I
2550 N1=N2
2560 RETURN
2570 REM SUBROUTINE CORRECT DATA POINT ENTRIES=====
=====
2580 PRINT "CORRECT ENTRY NUMBER : ";
2590 INPUT N2
2600 PRINT
2610 PRINT "[S](";N2;")=";X1(N2)
2620 PRINT "IS THIS CORRECT";
2630 INPUT D$
2640 IF D$="Y" THEN 2670
2650 PRINT "[S](";N2;")=";
2660 INPUT X1(N2)
2670 PRINT "Velocity(";N2;")=";Y1(N2)
2680 PRINT "IS THIS CORRECT";
2690 INPUT D$
2700 IF D$<>"N" THEN 2740
2710 PRINT "Velocity(";N2;")=";
2720 INPUT Y1(N2)
2730 PRINT
2740 PRINT "ARE THERE MORE CORRECTIONS ";
2750 INPUT D$
2760 IF D$<>"N" THEN 2580
2770 RETURN
2780 REM SUBROUTINE CORRECT PARAMETERS=====
=====
2790 PRINT "          PARAMETER          FIXED"
2800 FOR J=1 TO N9
2810 PRINT
2820 PRINT A$(J);
2830 D$="YES"
2840 IF I8(J)=1 THEN 2860
2850 D$="NO"
2860 PRINT A(J),D$
2870 PRINT
2880 PRINT "IS THIS CORRECT ";
2890 INPUT D$
2900 IF D$<>"N" THEN 2990
2910 PRINT
2920 PRINT A$(J);
2930 INPUT A(J)
2940 PRINT "TYPE Y/N TO FIX THIS PARAMETER ";
2950 INPUT D$
2960 I8(J)=0

```

```

2970 IF D$="N" THEN 2990
2980 I8(J)=1
2990 NEXT J
3000 RETURN
3010 REM SUBROUTINE STORE DATA ON DISK =====
=====
3020 PRINT "INSERT DATA DISK ON D-2!! WHAT IS THE DATAFILE NAME "
;
3030 INPUT D1$
3040 OPEN "2:"+D1$ FOR OUTPUT AS #1
3050 PRINT #1,T$
3060 PRINT #1,N1
3070 FOR J=1 TO N1
3080 PRINT #1,X1(J),Y1(J)
3090 NEXT J
3100 CLOSE #1
3110 RETURN
3120 REM SUBROUTINE INPUT THE DATA FROM DISK =====
=====
3130 PRINT "INSERT DATA DISK ON D-2 !! ":FILES 2:PRINT "WHAT IS T
HE DATAFILE NAME ";
3140 INPUT D1$
3150 OPEN "2:"+D1$ FOR INPUT AS #1
3160 INPUT #1,T$
3170 INPUT #1,N1
3180 FOR J=1 TO N1
3190 INPUT #1,X1(J),Y1(J)
3200 NEXT J
3210 CLOSE #1
3220 RETURN
3230 REM THIS SUBROUTINE EXCUTES THE FIT =====
=====
3240 PRINT
3250 PRINT "BEGINNING NON-LINEAR LEAST SQUARE FIT "
3260 PRINT
3270 L9(1)=.001
3280 L9(4)=0
3290 X2(1)=0
3300 X2(2)=0
3310 X2(3)=0
3320 N2=1
3330 N0=1
3340 FOR M8=1 TO M9
3350 PRINT "RUNNING ITERATION NUMBER ";M8 : 'BEEP
3360 GOSUB 3900
3370 IF F9(10)=1 THEN 3650
3380 PRINT
3390 PRINT "ITERATION NUMBER ";M8;" DONE"
3400 PRINT
3410 X2(1)=X2(3)-X2(2)

```

```

3420 S9=X2(1)/X2(2)
3430 PRINT " #      PARAMETER          PREVIOUS          DELTA          IR
EL DELTA"
3440 PRINT
3450 FOR J=1 TO N9
3460 J9(J)=ABS(D9(J)/A(J))
3470 PRINT J;:PRINT TAB(5);"";:PRINT USING"##.#####^"^";A(J);
3480 PRINT TAB(20);"";:PRINT USING"##.#####^"^";B9(J);
3490 PRINT TAB(35);:PRINT USING"##.#####^"^";D9(J);
3500 PRINT TAB(50);"";:PRINT USING"##.#####^"^";J9(J)
3510 NEXT J
3520 FOR J=1 TO N9
3530 IF J9(J)>L9(2) THEN 3570
3540 NEXT J
3550 REM =====
=====
3560 L9(4)=1+L9(4)
3570 REM =====
=====
3580 IF ABS(S9)>L9(3) THEN 3600
3590 L9(4)=L9(4)+2
3600 X2(3)=X2(2)
3610 IF L9(4)<>0 THEN 3680
3620 NEXT M8
3630 PRINT "!!! ITERATION COUNT EXCEEDED !!!"
3640 GOTO 3700
3650 PRINT "EMERGENCY!!!!!! EXIT !!!" :BEEP:BEEP:BEEP:BEEP
3660 F9(10)=0
3670 GOTO 3700
3680 PRINT "CONVERGED(MODE=.;L9(4);" )" :BEEP:BEEP:BEEP
3690 PRINT
3700 FOR K=1 TO N9
3710 FOR J=1 TO N9
3720 A9(K,J)=A7(K,J)
3730 NEXT J
3740 NEXT K
3750 GOSUB 4880
3760 FOR J=1 TO N9
3770 IF I8(J)=0 THEN 3790
3780 A9(J,J)=0
3790 I9(J)=SQR(X2(2)*A9(J,J)/N8)
3800 NEXT J
3810 PRINT "DO YOU WANT TO LIST THE RESULTS ";
3820 INPUT D$
3830 IF D$="N" THEN 3850
3840 GOSUB 5640
3850 PRINT "DO YOU WANT TO PLOT THE RESULTS";
3860 INPUT D$
3870 IF D$="N" THEN 3890
3880 GOSUB 6140

```

```

3890 RETURN
3900 REM CURVEFIT BEVINGTON STAT. ANAL. PG 238-239 =====
=====
3910 REM A7      ALPHA(N9,N9)
3920 REM A9      ARRAY(N9,N9)
3930 REM B9      BETA(N9)
3940 REM Y       DEPENDENT VARIABLE(N)
3950 REM D9      DERIV(N9)
3960 REM X2      CHI-SQ(3)
3970 REM        WGT=1 FOR ALL N
3980 REM Y1      OBS(N)
3990 FOR K=1 TO N9
4000 FOR J=1 TO N9
4010 A7(K,J)=0
4020 A9(K,J)=0
4030 NEXT J
4040 NEXT K
4050 X2(1)=0
4060 FOR K=1 TO N9
4070 B9(K)=0
4080 NEXT K
4090 N7=(N1-N0+1)/N2
4100 N8=N7-N9
4110 FOR I=N0 TO N1
4120 X=X1(I)
4130 GOSUB 5900
4140 W1=Y
4150 FOR L1=1 TO N9
4160 D9(L1)=0
4170 NEXT L1
4180 FOR J=1 TO N9
4190 IF I8(J)<>0 THEN 4250
4200 A0=A(J)
4210 A(J)=A(J)*1.001+.000001
4220 GOSUB 5900
4230 A(J)=A0
4240 D9(J)=(Y-W1)/(A0*.001+.000001)
4250 NEXT J
4260 FOR J=1 TO N9
4270 IF I8(J)<>0 THEN 4330
4280 B9(J)=B9(J)+(Y1(I)-W1)*D9(J)
4290 FOR K=J TO N9
4300 A7(J,K)=A7(J,K)+D9(J)*D9(K)
4310 NEXT K
4320 GOTO 4340
4330 A7(J,J)=1
4340 NEXT J
4350 X2(1)=X2(1)+(Y1(I)-W1)^2
4360 NEXT I
4370 FOR J=1 TO N9-1

```

```

4380 FOR K=J+1 TO N9
4390 A7(K,J)=A7(J,K)
4400 NEXT K
4410 NEXT J
4420 FOR J=1 TO N9
4430 FOR K=1 TO N9
4440 A9(J,K)=A7(J,K)/SQR(A7(J,J)*A7(K,K))
4450 NEXT K
4460 IF I8(J)<>0 THEN 4480
4470 A9(J,J)=1+L9(1)
4480 NEXT J
4490 GOSUB 4880
4500 FOR L1=1 TO N9
4510 I9(L1)=A(L1)
4520 NEXT L1
4530 FOR J=1 TO N9
4540 FOR K=1 TO N9
4550 I9(J)=I9(J)+B9(K)*A9(J,K)/SQR(A7(J,J)*A7(K,K))
4560 NEXT K
4570 NEXT J
4580 FOR L1=1 TO N9
4590 J9(L1)=A(L1)
4600 NEXT L1
4610 FOR L1=1 TO N9
4620 A(L1)=I9(L1)
4630 NEXT L1
4640 X2(2)=0
4650 FOR I=N0 TO N1
4660 X=X1(I)
4670 GOSUB 5900
4680 X2(2)=X2(2)+(Y1(I)-Y)^2
4690 NEXT I
4700 IF X2(2)<=X2(1) THEN 4770
4710 IF F9(10)-1=>0 THEN 4770
4720 L9(1)=10*L9(1)
4730 FOR L1=1 TO N9
4740 A(L1)=J9(L1)
4750 NEXT L1
4760 GOTO 4420
4770 FOR L1=1 TO N9
4780 D9(L1)=J9(L1)-A(L1)
4790 B9(L1)=J9(L1)
4800 NEXT L1
4810 FOR K=1 TO N9
4820 FOR J=1 TO N9
4830 A9(K,J)=A7(K,J)
4840 NEXT J
4850 NEXT K
4860 L9(1)=L9(1)/10
4870 RETURN

```

```

4880 REM MATRIX INVERSION BEVINGTON STAT. ANAL. PG 302-303 =====
=====
4890 REM A8      AMAX
4900 REM A9      ARREY
4910 REM D8      DET
4920 REM I9      IK
4930 REM J9      IJ
4940 REM I,J,K,L ARE INDICES
4950 D8=1
4960 FOR K=1 TO N9
4970 A8=0
4980 FOR I=K TO N9
4990 FOR J=K TO N9
5000 IF ABS(A8)>ABS(A9(I,J)) THEN 5040
5010 A8=A9(I,J)
5020 I9(K)=I
5030 J9(K)=J
5040 NEXT J
5050 NEXT I
5060 IF A8<>0 THEN 5110
5070 FOR L1=1 TO N9
5080 D9(L1)=0
5090 NEXT L1
5100 RETURN
5110 I=I9(K)
5120 IF I<K THEN 4980
5130 IF I=K THEN 5200
5140 IF I>K THEN 5150
5150 FOR J=1 TO N9
5160 S9=A9(K,J)
5170 A9(K,J)=A9(I,J)
5180 A9(I,J)=-S9
5190 NEXT J
5200 J=J9(K)
5210 IF J<K THEN 4980
5220 IF J=K THEN 5290
5230 IF J>K THEN 5240
5240 FOR I=1 TO N9
5250 S9=A9(I,K)
5260 A9(I,K)=A9(I,J)
5270 A9(I,J)=-S9
5280 NEXT I
5290 FOR I=1 TO N9
5300 IF I=K THEN 5320
5310 A9(I,K)=-A9(I,K)/A8
5320 NEXT I
5330 FOR I=1 TO N9
5340 FOR J=1 TO N9
5350 IF I=K THEN 5380
5360 IF J=K THEN 5380

```

```

5370 A9(I,J)=A9(I,J)+A9(I,K)*A9(K,J)
5380 NEXT J
5390 NEXT I
5400 FOR J=1 TO N9
5410 IF J=K THEN 5430
5420 A9(K,J)=A9(K,J)/A8
5430 NEXT J
5440 A9(K,K)=1/A8
5450 NEXT K
5460 FOR L=1 TO N9
5470 K=N9-L+1
5480 J=I9(K)
5490 IF J<=K THEN 5550
5500 FOR I=1 TO N9
5510 S9=A9(I,K)
5520 A9(I,K)=-A9(I,J)
5530 A9(I,J)=S9
5540 NEXT I
5550 I=J9(K)
5560 IF I<=K THEN 5620
5570 FOR J=1 TO N9
5580 S9=A9(K,J)
5590 A9(K,J)=-A9(I,J)
5600 A9(I,J)=S9
5610 NEXT J
5620 NEXT L
5630 RETURN
5640 REM SUBROUTINE LIST FINAL RESULTS =====
=====
5650 CLS 1
5660 PRINT "FINAL RESULTS:";T$
5670 PRINT
5680 PRINT "PARAMETER                VALUE                ERROR"
5690 FOR J=1 TO N9
5700 PRINT A$(J);
5710 IF I8(J)=0 THEN 5740
5720 PRINT TAB(22);"";:PRINT USING"##.#####^";A(J);:PRINT TAB(
43);"FIXED"
5730 GOTO 5760
5740 PRINT TAB(22);"";:PRINT USING"##.#####^";A(J);
5750 PRINT TAB(42);"";:PRINT USING"##.#####^";I9(J)
5760 NEXT J
5770 PRINT
5780 PRINT "THE DATA AND THE FIT"
5790 PRINT " #                [S]                Velocity                Y BEST                DE
VIATION"
5800 FOR I=1 TO N1
5810 X=X1(I)
5820 GOSUB 5900
5830 PRINT I;:PRINT TAB(5);"";:PRINT USING"##.#####^";X1(I);

```

```

5840 PRINT TAB(20);"";:PRINT USING"##.####^ ^ ^";Y1(I);
5850 PRINT TAB(35);"";:PRINT USING"##.####^ ^ ^";Y;
5860 PRINT TAB(50);"";:PRINT USING"##.####^ ^ ^";Y1(I)-Y
5870 NEXT I
5880 PRINT
5890 RETURN
5900 REM SUBROUTINE SETUP
5910 L=F9(1)
5920 ON L GOTO 5930,5960
5930 REM SIMPLE M-M =====
=====
5940 Y=A(1)*X/(X+A(2))
5950 RETURN
5960 REM TWO ENZYME VARIATION =====
=====
5970 Y=A(1)*X/(A(2)+X)+A(3)*X/(A(4)+X)
5980 RETURN
5990 REM SUBROUTINE GRAPHIC =====
=====
6000 IF N9=4 THEN 6030
6010 DEF FNM(X)=A(1)*X/(X+A(2))
6020 GOTO 6040
6030 DEF FNM(X)=A(1)*X/(A(2)+X)+A(3)*X/(A(4)+X)
6040 LINE(100,0)-(635,345),,B
6050 LINE(100,25)-(105,25)
6060 LINE(100,105)-(105,105)
6070 LINE(100,185)-(105,185)
6080 LINE(100,265)-(105,265)
6090 LINE(230,345)-(230,340)
6100 LINE(360,345)-(360,340)
6110 LINE(490,345)-(490,340)
6120 LINE(620,345)-(620,340)
6130 RETURN
6140 REM SUBROUTINE PLOT RESULTS =====
=====
6150 SCREEN 2:CLS 1
6160 V=LOG(Y1(N1))/LOG(10)
6170 V0=INT(V)
6180 V0=ABS(V0)
6190 IF V=>1 THEN V0=10^(-V0)
6200 IF V<1 THEN V0=10^V0
6210 W=LOG(X1(N1))/LOG(10)
6220 W0=INT(W)
6230 W0=ABS(W0)
6240 IF W=>1 THEN W0=10^(-W0)
6250 IF W<1 THEN W0=10^W0
6260 O=Y1(N1)*V0
6270 O0=INT(O)
6280 IF O-O0=0 THEN O9=O0
6290 IF 0<O-O0 AND O-O0=<.2 THEN O9=O0+.2

```

```

6300 IF .2<O-O0 AND O-O0=<.4 THEN O9=O0+.4
6310 IF .4<O-O0 AND O-O0=<.6 THEN O9=O0+.6
6320 IF .6<O-O0 AND O-O0=<.8 THEN O9=O0+.8
6330 IF .8<O-O0 AND O-O0<1 THEN O9=O0+1
6340 P=X1(N1)*W0
6350 P0=INT(P)
6360 IF P-P0=0 THEN P9=P0
6370 IF 0<P-P0 AND P-P0=<.2 THEN P9=P0+.2
6380 IF .2<P-P0 AND P-P0=<.4 THEN P9=P0+.4
6390 IF .4<P-P0 AND P-P0=<.6 THEN P9=P0+.6
6400 IF .6<P-P0 AND P-P0=<.8 THEN P9=P0+.8
6410 IF .8<P-P0 AND P-P0<1 THEN P9=P0+1
6420 O1=O9/V0
6430 P1=P9/W0
6440 GOSUB 5990
6450 FOR X=0 TO P1 STEP P1/520
6460 Y=345-(320/O1)*FNM(X)
6470 PSET(X*(520/P1)+100,Y)
6480 NEXT X
6490 FOR I=1 TO N1
6500 U1=X1(I)*(520/P1)+100
6510 U2=345-(320/O1)
        *Y1(I)
6520 FOR J1=-2 TO 2
6530 FOR J2=-2 TO 2
6540 PSET (U1+J1,U2+J2)
6550 NEXT J2
6560 NEXT J1
6570 NEXT I
6580 LOCATE 7,1:PRINT USING"###.###";O9
6590 LOCATE 8,6:PRINT USING"###.###";O9*.75
6600 LOCATE 8,11:PRINT USING"###.###";O9*.5
6610 LOCATE 8,16:PRINT USING"###.###";O9*.25
6620 LOCATE 11,21:PRINT "0"
6630 LOCATE 0,10:PRINT "Velocity"
6640 LOCATE 1,11:PRINT "X"
6650 LOCATE 0,12:PRINT USING"###.#####";V0
6660 LOCATE 27,22:PRINT USING"###.###";P9*.25
6670 LOCATE 43,22:PRINT USING"###.###";P9*.5
6680 LOCATE 60,22:PRINT USING"###.###";P9*.75
6690 LOCATE 75,22:PRINT USING"###.###";P9
6700 LOCATE 40,23:PRINT "[S] X"
6710 LOCATE 46,23:PRINT USING"###.#####";W0
6720 LOCATE 20,1:PRINT T$
6730 RETURN

```

```

1000 'save "B-f&n1111"
1010 'mitochondria BINDING (B-f&n) 85/11/01 *****
*****
1020 E=1 :DIM UE(E,6),CO(E,6),B(E),E(E),A(1324,2) :SEMIN=1E+30
1030 FOR I=1 TO 6 :READ K1(I),A1(I):PRINT A1(I)/K1(I):NEXT I
1040 FOR J=1 TO 6 :READ P$(J),CO(1,J),UE(1,J) :NEXT
1070 INPUT "vi=";V:INPUT "f[0-?],n[0-?]" ;FD,ND :INPUT "step 0.
1 OR 0.05";DF
1080 F=96484.6:R=8.314:T=298.15
1090 '=====
=====
1100 DD=15 :ST=1 : 'MIN.VALUE OF DN&DF =0.05
1110 S=1
1120 FOR NN=0 TO ND+.01 STEP DF
1130 FOR FF=0 TO FD+.01 STEP DF :PRINT:PRINT "S,f,n";S,FF,
NN
1140 Z=Z+1:A(Z,1)=FF:A(Z,2)=NN :N1=0 :A8=0:A9=0
1150 FOR J=1 TO 6 :K=K1(J):A=A1(J):IF K=0 GOTO 1300
1160 :CO=CO(S,J):U=UE(S,J)
1170 IF CO=0 GOTO 1300
1180 C1=CO :C2=U/V : 'PRINT CO,U
1190 '-----
1200 N1=N1+1:IF N1<200 THEN CIA=(C1+C2)/2 ELSE BEEP:GOTO 1270
1210 'ON ERROR GOTO 2100
1220 E(S)=R*T/F*LOG(CO/CIA) :CI=CO*EXP(-F*E(S)/R/T)
1230 'B(S)=FF*A*CO/(K*EXP(NN*F*E(S)/R/T)+CO)+(1-FF)*A*CI/(K*EXP(-
NN*F*E(S)/R/T)+CI)
1232 B(S)=(FF*EXP(-NN*F*E(S)/R/T)+(1-FF)*EXP((NN-1)*F*E(S)/R/T))*
A/K*CO
1240 CIB=(U-B(S))/V
1250 IF CIB<CIA THEN C2=CIA :GOTO 1200
1260 IF ABS(1-CIB/CIA)<.001 THEN GOTO 1270 ELSE C1=CIA :GOTO 1200

1270 'PRINT "E =";E(S)*1000;
1280 C(J)=E(S)*1000
1290 N=N+1:A8=A8+C(J) : A9=A9+(C(J))^2
1300 NEXT J
1310 A(Z,0)=A(Z,0)+SQR((A9-(A8)^2/N)/N/N)
1320 PRINT "EE";A8/N,A(Z,0):N=0 :IF SEMIN>A(Z,0) THEN SEMIN=A(Z,
0):FM=FF:NM=NN
1330 NEXT FF
1340 NEXT NN :Q=Z:Z=0:CLS:GOTO 1420:
1350 END : '-----
-----
1360 '=====
=====
1370 '
1380 '
1390 '
1400 '

```

```

1410 RESUME 1300
1420 *THREE :SCREEN 2,0,0,1:'=====
=====
1430 PX=300:PY=300:PZ=10/DD*ST*15/.6:PXX=.8:PYY=1:OO=400 :MS=0
:BEEP:BEEP
1440 IF S2=0 THEN S2=1:GOTO 1460
1450 IF S2=1 THEN S2=0:GOTO 1460
1460 CLS :SCREEN ,MS,S2:ROLL 399:ROLL 1
1470 FOR Z=1 TO Q :X1=A(Z,1):Y1=A(Z,2) :Z1=A(Z,0)
1480 X1=X1*PX :Y1=Y1*PY :Z1=Z1*PZ
1490 XX=200+(X1-Y1/2)*PXX:YY=OO-Z1*2-Y1*PYY
1500 IF X1>0 THEN LINE(XX1,YY1)-(XX,YY)
1510 XX1=XX:YY1=YY
1520 NEXT Z
1530 '
1540 FOR I=1 TO 1/DF+1
1550 FOR J=0 TO Q STEP 1/DF+1
1560 Z=I+J :IF Z>Q GOTO 1620
1570 X1=A(Z,1):Y1=A(Z,2) :Z1=A(Z,0)
1580 X1=X1*PX :Y1=Y1*PY :Z1=Z1*PZ
1590 XX=200+(X1-Y1/2)*PXX:YY=OO-Z1*2-Y1*PYY
1600 IF Y1>0 THEN LINE(XX1,YY1)-(XX,YY)
1610 XX1=XX:YY1=YY
1620 NEXT J
1630 NEXT I
1640 IF S2=0 THEN SCREEN 2,0,0,1
1650 IF S2=1 THEN SCREEN 2,0,1,2
1655 LOCATE 0,10:PRINT "min,f,n,se=";FM,NM,SEMIN
1660 LOCATE 0,19:PRINT "up"
1670 LOCATE 0,20:PRINT "down"
1680 LOCATE 0,21:PRINT "right"
1690 LOCATE 0,22:PRINT "left"
1700 LOCATE 0,23:PRINT "+"
1710 LOCATE 0,24:PRINT "-"
1720 IF INP(&HE8)=253 THEN OO=OO-20 :GOTO 1440
1730 IF INP(&HEA)=253 THEN OO=OO+20 :GOTO 1440
1740 IF INP(&HE8)=251 THEN PY=PY-20 :GOTO 1440
1750 IF INP(&HEA)=251 THEN PY=PY+20 :GOTO 1440
1760 IF INP(&HE1)=247 THEN PZ=PZ*1.2:GOTO 1440
1770 IF INP(&HEA)=223 THEN PZ=PZ/1.2:GOTO 1440
1780 GOTO 1720
1790 '=====
=====

```

```

1000 'save "K 33A",A :*****
1005 DATA "TIME(sec.)          MIN.", "          MAX."
, " ", "lnU'=ln{(Ue-U)/Ue}    MIN.", "          MAX.":FOR
K=1 TO 5:READ Al$(K):NEXT K
1010 WIDTH 80,25:CONSOLE 0,25,0,0:SCREEN 2,0:SCREEN ,3:CLS 3:SCRE
EN ,0:DIM T(2410),U(2410):I=0:N=0:SP=0:R=8.314:F=96484.4:GOTO 103
0
1020 *BBEEP:FOR BB=0 TO 2:BEEP 1:FOR BBB=0 TO 100:NEXT BBB:BEEP 0
:FOR BBB=0 TO 100:NEXT BBB:NEXT BB:RETURN
1030 *DATAINPUT
1040 FILES 2:GOSUB *BBEEP:INPUT "File name 

```

```

2080 UMAX1=(B(4)/1000*B(3)-B(4)/1000*B(3)*EXP(-F*DEL/1000/R/T))/P
C
2090 *GRAPH1 :SCREEN ,3:CLS 3:SCREEN ,0
2100 FOR K=0 TO 10:LINE (37,344/10*K)-(41,344/10*K):NEXT K
2110 FOR K=0 TO H:LINE (39+600*(TT(K)-TT(0))/(TT(H)-TT(0)),342)-
(39+600*(TT(K)-TT(0))/(TT(H)-TT(0)),346):LOCATE (39+600*(TT(K)-TT(
0))/(TT(H)-TT(0)))/8-1,22:PRINT USING "#";K+1 :NEXT K :LOCATE 1,0
:PRINT 1:LOCATE 1,21:PRINT 0
2120 LOCATE 0,9:PRINT "U/Umax":LOCATE 35,23:PRINT "Time scale No.
"
2130     FOR K=TT(0)*2 TO I-1
2140 X=(T(K)-TT(0))/(TT(H)-TT(0))*600+39 :Y=344-U(K)/UMAX1*344:PS
ET(X,Y)
2150     NEXT K :GOSUB *BBEEP
2160 LOCATE 6,2:INPUT "Lprint compensated data(y/n)";LC$:IF LC$="
y" OR LC$="Y" THEN GOSUB *LLPRINT
2170 LOCATE 6,2:PRINT SPC(72):GOSUB *BBEEP
2180 LOCATE 6,2 :INPUT "Copy(y/n)";CP$:IF CP$="y" OR CP$="Y" THEN
LOCATE 6,2:PRINT SPC(20):COPY
2190 LOCATE 6,2:INPUT "TIME SCALE No. :[min.],[max.] ";TS1,TS2
2200 R(1)=TT(TS1-1):R(2)=TT(TS2-1):R(5)=0:R(4)=-10: TR=R(2)-R(1):
UR=R(5)-R(4):GOTO *CHANGE2
2210 *SELECT :GOSUB *BBEEP
2220 LOCATE 7,0:INPUT "1.Graph size change 2.copy 3.Start point
4.Least squares method";GGL :FOR K=0 TO 200:NEXT K :LOCATE 7,0:
PRINT SPC(72)
2230 IF GGL=1 GOTO *CHANGE1
2240 IF GGL=2 THEN COPY:LPRINT CHR$(12) :GOTO 2210
2250 IF GGL=3 GOTO *PPOINT
2260 IF GGL=4 GOTO *LEAST ELSE GOTO 2210
2270 *CHANGE1
2280 FOR K=10 TO 14:LOCATE 10,K:PRINT Al$(K-9):NEXT K
2290 FOR K=10 TO 14:LOCATE 36,K:IF K=12 GOTO 2300 ELSE INPUT R(K-
9)
2300 NEXT K
2310 TR=R(2)-R(1):UR=R(5)-R(4)
2320 *CHANGE2 :SCREEN ,3:CLS 3:SCREEN ,0
2330 LINE (39,0)-(39,344):LINE (39,344)-(639,344)
2340 FOR K=0 TO 9:LINE (37,344/10*K)-(41,344/10*K):NEXT K
2350 FOR K=1 TO 10:LINE (39+600/10*K,342)-(39+600/10*K,346):NEXT
K
2360 LOCATE 0,10:PRINT "lnU'":LOCATE 35,23:PRINT "Time (sec.)"
2370 LOCATE 0,0:PRINT USING "###.##";R(4):LOCATE 0,21:PRINT USING
"###.##";R(5)
2380 LOCATE 73,22:PRINT USING "###.##";R(2):LOCATE 3,22:PRINT USI
NG "###.##";R(1);
2390     FOR K=R(1)*2 TO R(2)*2
2400 ON ERROR GOTO 2470
2410 IF TS1=1 THEN Y=LOG((UE(TS2-1)-U(K))/UE(TS2-1)):GOTO 2440
2420 IF TS1>1 AND UE(TS1-1)<UE(TS2-1) THEN Y=LOG((UE(TS2-1)-U(K))
/(UE(TS2-1)-UE(TS1-1))):GOTO 2440

```

```

2430 IF UE(TS1-1)>UE(TS2-1) THEN Y=LOG((U(K)-UE(TS2-1))/(UE(TS1-1)-UE(TS2-1)))
2440 YY=344+(Y-R(5))/UR*344 :XX=(T(K)-R(1))/TR*600+39
2450 PSET(XX,YY)
2460 NEXT K
2470 IF ERR=5 THEN RESUME 2460
2480 MM=K:IF SP<>0 GOTO *LEAST2 ELSE GOTO *SELECT
2490 *PPOINT
2500 Y=344:X=39
2510 IN$=INKEY$:IF IN$="" GOTO 2510
2520 IF INP(&HE8)=251 THEN PSET(X,Y):X=X+1:PRESET(X,Y)
2530 IF INP(&HEA)=251 THEN PSET(X,Y):X=X-1:PRESET(X,Y)
2540 IF INP(&HE1)=127 THEN SP=R(1)+(X-39)/600*(R(2)-R(1)):LOCATE 0,23:PRINT "Start point="SP:GOTO *SELECT ELSE GOTO 2510
2550 *LEAST
2560 FOR K=10 TO 14:LOCATE 10,K:PRINT A$(K-9):NEXT K
2570 LOCATE 36,10:PRINT SP:R(1)=SP
2580 FOR K=11 TO 14:LOCATE 36,K:IF K=12 GOTO 2590 ELSE INPUT R(K-9)
2590 NEXT K
2600 GOTO 2310
2610 *LEAST2
2620 LOCATE 7,0:INPUT "1.Graph size change 2.Least squares method";GL
2630 IF GL=1 GOTO *LEAST
2640 IF GL=2 THEN LOCATE 7,0:PRINT SPC(72):GOTO *LEAST3 ELSE GOTO *LEAST2
2650 *LEAST3
2660 X1=0:X2=0:Y1=0:Y2=0:XY=0:N=0:K=TT(TS1-1)*2
2670 IF T(K)>=SP THEN GOSUB *BBEEP:GOTO 2680 ELSE K=K+1 :GOTO 2670
2680 IF TS1=1 THEN Y=LOG((UE(TS2-1)-U(K))/UE(TS2-1)):GOTO 2710
2690 IF TS1>1 AND UE(TS1-1)<UE(TS2-1) THEN Y=LOG((UE(TS2-1)-U(K))/(UE(TS2-1)-UE(TS1-1))):GOTO 2710
2700 IF UE(TS1-1)>UE(TS2-1) THEN Y=LOG((U(K)-UE(TS2-1))/(UE(TS1-1)-UE(TS2-1)))
2710 YY=344+(Y-R(5))/UR*344 :XX=(T(K)-R(1))/TR*600+39
2720 PRESET(XX,YY):FOR M=0 TO 100:NEXT M:PSET(XX,YY):FOR M=0 TO 100:NEXT M
2730 IF INP(&HE0)=&HFD THEN GOTO 2760
2740 IF INP(&HE0)=&HFE THEN K=K+1:GOTO 2680
2750 IF INP(&HE1)=&H7F THEN GOTO 2800 ELSE GOTO 2720
2760 *LEAST4
2770 CIRCLE (XX,YY),1
2780 X=T(K)-SP:X1=X1+X:X2=X2+X*X:Y1=Y1+Y:Y2=Y2+Y*Y:XY=XY+X*Y:N=N+1
2790 K=K+1:GOTO 2680
2800 S1=XY-X1*Y1/N:S2=X2-X1*X1/N:S3=Y2-Y1*Y1/N
2810 R2=(S1/SQR(S2*S3))^2:B=S1/S2:A=(Y1-B*X1)/N
2820 GOSUB *BBEEP :LOCATE 7,1:PRINT "ln{(Ue-U)/Ue} = ("A")+("B")
.t r2="R2

```

```

2830 FOR I=1 TO I:A$=INKEY$:NEXT I:GOSUB *BBEEP :GOSUB *LLL
2840 LOCATE 7,0:PRINT SPC(72):LOCATE 7,0:INPUT "1.Once more      2.c
opy ";OC
2850 IF OC=1 THEN GOSUB *BBEEP:SP=0:GOTO 2190
2860 IF OC=2 THEN LOCATE 7,0:PRINT SPC(70):LOCATE 7,0:PRINT FI$,B
(3),"Ue="UE(TS2-1):COPY:LPRINT CHR$(12):GOTO 2840 ELSE 2840
2870 *COMPENSATION
2880 LOCATE 6,2:PRINT "Compensation of baseline : E(min.)=E(max.
)"
2890 LOCATE 8,4:INPUT "Time range(scale No.) [min.],[max.] ";A1,
A2
2900 B1=AB(A1-1):B2=AB(A2-1)
2910 LOCATE 10,10:PRINT "CALCULATING !"
2920 A=B1-(B2-B1)*TT(A1-1)/(TT(A2-1)-TT(A1-1)) :B=(B2-B1)/(TT(A2-
1)-TT(A1-1))
3000 FOR K=TT(A1-1)*2 TO TT(A2-1)*2
3010 U(K)=U(K)-(A+B*T(K)-B1)
3020 NEXT K
3030 FOR K=1 TO H:N=0 :AB=0
3040 FOR J=TT(K)*2-10*2 TO TT(K)*2-2 :AB=AB+U(J):N=N+1:NEXT J:
AB(K)=AB/N
3050 E(K)=AB(K)-R*T/F*LOG(V/B(4))*1000
3060 CO(K)=B(3)*EXP(-F/R/T*E(K)/1000)
3070 UE(K)=(B(4)*B(3)-B(4)*B(3)*EXP(-F*E(K)/1000/R/T))/PC/1000

3100 UB=UE(1)-B(6)*.000001*CO(1)
3110 DUE(K)=UE(K)-UB
3120 CI(K)=DUE(K)*1E+06/B(6) : IF DUE(K)=< 0 THEN DE(K)=0:GOTO
3500
3130 DE(K)=R*T/F*LOG(CI(K)/CO(K))*1000
3500 NEXT K :K=0
4000 RETURN
5000 *LLPRINT:LPRINT :LPRINT
5010 LPRINT "***** Compensated data *****"
5020 LPRINT "File name :";FI$,B$(1)
5030 LPRINT " Time(sec.)    Calcu.E(mV)    Co(mol/l)    Ue(mg/
ml)    Ci(mol/l)    dE(mV)"
5035 FOR K=1 TO H
5040 LPRINT USING " #####.##      #####.###      ###.##^
^
^      ###.##^
^
^      #####.##";TT(K),E(K),CO(K),UE(K),CI(K),DE(K)
5050 NEXT K
5060 RETURN
6000 *LLL:LPRINT
6010 LPRINT "Start point=";R(1);"      ";[";T(K-1)-INT(N/2);"] - [
";T(K-1);"]"
6050 LPRINT "ln{(Ue-U)/Ue} = ("A")+("B").t      r2="R2
6090 RETURN

```

```

1 'save "K FPF4
1000 '***** K FPF2      RAPH *****
1010 WIDTH 80,25:CONSOLE 0,25,0,0:CLS:FOR I=0 TO 2:SCREEN 2,0,I,7
:ROLL 399:ROLL 1:NEXT:SCREEN ,0,0
1012 DATA "TIME(sec.)      MIN.", "      MAX."
, " ", "Ue      MAX.", "      MIN.":FOR
K=1 TO 5:READ A$(K):NEXT K
1014 INPUT "Have you treated data for simplex(y/ )";X$:IF X$="y"
GOTO *E
1020 DIM T(1000),U(1000),TX(1000),CY(1000),C$(12),C(12):I=0:N=0:S
P=0:R=8.314:F=96484.6:GOTO 1040
1030 *BBEEP:FOR BB=0 TO 2:BEEP 1:FOR BBB=0 TO 100:NEXT BBB:BEEP 0
:FOR BBB=0 TO 100:NEXT BBB:NEXT BB:RETURN
1040 *DATAINPUT : '=====
=====
1045 INPUT "SET ORIGINAL DATA DISKET ON D-2 AND NEW DISKET D-1.
[RET]",X
1050 CLS:FOR I=0 TO 2:SCREEN 2,0,I,7:ROLL 399:ROLL 1:NEXT:SCREEN
,0,0
1052 PRINT:FILES 2:GOSUB *BBEEP:INPUT "File name -----";FI$:F
FI$="2:"+FI$
1060 OPEN FFI$ FOR INPUT AS #1
1065 FOR J=2 TO 12:LINE INPUT #1,C$(J):NEXT J:INPUT #1,CN1,YR1,SA
MPT,DN1,N1
1067 FOR J=2 TO 12:C(J)=VAL(C$(J)):NEXT J
1070 FOR J=0 TO DN1:INPUT #1,U(J):NEXT J :CLOSE #1
1100 *CALCULATION : '=====
=====
1105 LOCATE 10,17:PRINT "CALCULATING !":T=C(12)+273.15
1110 TV=R*T/F*LOG((C(8)+C(10)/1000)/C(8)): P=C(9)*C(10)/1000
1112 E1=0:FOR K=0 TO N1-1:E1=E1+U(K):NEXT:E1=E1/N1
1120 E2=0:FOR K=0 TO N1-1:E2=E2+U(DN1-K):NEXT:E2=E2/N1
1130 FOR K=0 TO DN1
1170 DE1=U(K)-E1+TV: U(K)=(C(8)/1000*C(7)-C(8)/1000*C(7)*EXP(F*D
E1/R/T))/P
1172 NEXT
1174 DE1=E2-E1+TV: UE=(C(8)/1000*C(7)-C(8)/1000*C(7)*EXP(F*DE1/R
/T))/P
1180 TR=(INT((DN1*SAMPT)/60)+1)*60:UR=UE:R(2)=TR:R(4)=UE:GOTO *CH
ANGE2
1200 *SELECT :GOSUB *BBEEP : '=====
=====
1210 LOCATE 7,1:INPUT "1.Graph size change 2.copy 3.Start point
4.Data file ";GGL :FOR K=0 TO 100:NEXT K
1220 IF GGL=1 THEN LOCATE 7,1:PRINT SPC(72):GOTO *CHANGE1
1230 IF GGL=2 THEN LOCATE 7,1:PRINT SPC(72):COPY:GOTO 1200
1235 IF GGL=3 THEN LOCATE 7,1:PRINT SPC(72):GOTO *PPOINT
1240 IF GGL=4 THEN LOCATE 7,1:PRINT SPC(72):GOTO *DFILE ELSE GOTO
1210
1300 *CHANGE1

```

```

1310 FOR K=10 TO 14:LOCATE 10,K:PRINT A$(K-9):NEXT K
1320 FOR K=10 TO 14:LOCATE 36,K:IF K=12 GOTO 1330 ELSE INPUT R(K-
9)
1330 NEXT K
1340 TR=R(2)-R(1):UR=R(4)-R(5)
1350 *CHANGE2 :IF GGL=4 GOTO 1360 ELSE SCREEN ,3:CLS 3:SCREEN ,0
1360 LINE (39,0)-(39,344):LINE (39,344)-(639,344)
1370 FOR K=0 TO 9:LINE (37,344/10*K)-(41,344/10*K):NEXT K
1380 FOR K=1 TO 10:LINE (39+600/10*K,342)-(39+600/10*K,346):NEXT
K
1385 LOCATE 0,10:PRINT "Ue":LOCATE 35,23:PRINT "Time (sec.)"
1390 LOCATE 5,0:PRINT USING "##.##^ ^ ^";R(4):LOCATE 0,21:PRINT US
ING "##.##";R(5)
1400 LOCATE 73,22:PRINT USING "##.##";R(2):LOCATE 3,22:PRINT USI
NG "##.##";R(1);
1500     FOR K=0 TO DN1      :X=(SAMPT*K-R(1))/TR*600+39:Y=344-U(K)/
UR*344
1510 IF Y<0 GOTO 1560 ELSE PSET(X,Y)
1560     NEXT
1570 GOTO *SELECT
1600 *PPOINT
1610 Y=344:X=39
1620 IF INP(&HE8)=&HFB THEN PSET(X,Y):X=X+1:PRESET(X,Y)
1630 IF INP(&HEA)=&HFB THEN PSET(X,Y):X=X-1:PRESET(X,Y)
1640 IF INP(&HEL)=&H7F THEN SP=R(1)+(X-39)/600*(R(2)-R(1)):LOCATE
0,23:PRINT "Start point="SP:GOTO *SELECT ELSE GOTO 1620
4000 *DFILE : '=====
=====
6500     FOR K=0 TO DN1
6505 T=K*SAMPT :IF T<SP GOTO 6560 ELSE IF Z=0 THEN DSP=T-SP:Z=1
6510 X=(T-R(1))/TR*600+39 :Y=344-(U(K)-R(5))/UR*344
6540 IF Y<0 GOTO 6560 ELSE CIRCLE(X,Y),2
6555 MM=MM+1:CY(MM)=(UE-U(K))/UE:IF MM=500 GOTO 6570
6560     NEXT K
6570 LOCATE 7,1:LOCATE 47,0:PRINT SPC(25):LOCATE 30,0:PRINT "all
plots=";DN1;"file points=";MM;:LOCATE 7,1:INPUT "DATA FILE (y/n)"
;D$
7000 '=====
=====
7010 INPUT "          FILE ON D-2(YES=0)      ";X:IF X=0 THEN N$="2:" E
LSE N$="1:"
7012 FILES 2:PRINT:PRINT FI$:INPUT "file name";Q$:OPEN N$+Q$ FOR
OUTPUT AS #1
7020 PRINT #1,MM,SAMPT,DSP:WRITE #1,FI$,C$(6)
7030 FOR K=1 TO MM:PRINT #1,CY(K):NEXT K :CLOSE #1
7070 *E:CLS:INPUT "0.RESTART    1.RUN SIMPLEX ";X
7080 IF X=1 THEN RUN "SX1007" ELSE IF X=0 THEN MM=0:GGL=0:GOTO 10
50 ELSE 7070

```

```

1000 'save "SX1007",A
1010 GOTO *START          : '**** 1030 ....CHANGE FROM [I=1] TO [
I=0] !!!!
1020 '==== Calculation of SS =====
=====
1030 *SS: SS=0:FOR I=0 TO N: SS=SS+(Y(I)-FNY)^2/Y(I)^W :NEXT :RE
TURN
1040 '==== Simplex Method =====
=====
1050 *SIMPLEX : AA=1:BB=.5:CC=2:SG=1E+10:'PC=.00001
1060 FOR I=1 TO P : A(I,1)=P(I) : NEXT
1080 FOR J=2 TO P+1:FOR I=1 TO P:A(I,J)=(1+ER*(2*RND(1)-1)/100)*A
(I,1):NEXT:NEXT
1090 FOR K=1 TO P+1:FOR I=1 TO P :P(I)=A(I,K) :NEXT:GOSUB*SS: A(0
,K)=SS:NEXT
1100 *DISPLAY:PRINT:FOR I=1 TO P+1: PRINT "SS";I;" = ";A(0,I):NEX
T:PRINT TIMES,
1110 ' ==== CHECK =====
=====
1120 SR=0 : FOR I=1 TO P+1 : SR=SR+A(0,I) :NEXT :SSS=ABS(SR-SG)/S
G:PRINT SSS
1130 IF SSS<PC THEN FOR I=1 TO P:P(I)=A(I,JL):NEXT:SS=A(0,JL):RET
URN
1140 '=====
=====
1150 SG=SR : SR=0 : SL=1E+10
1160 FOR J=1 TO P+1
1170 IF SR<A(0,J) THEN JH=J : SR=A(0,J)          ' Maximum SS
1180 IF SL>A(0,J) THEN JL=J : SL=A(0,J)          ' Minimum SS
1190 NEXT :SR=0
1200 FOR J=1 TO P+1:IF J<>JH AND SR<A(0,J) THEN JS=J : SR=A(0,J)
' second SS
1210 NEXT:FOR I=1 TO P:Z(0,I)=0:FOR J=1 TO P+1
1220 IF J<>JH THEN Z(0,I)=Z(0,I)+A(I,J)
1230 NEXT: Z(0,I)=Z(0,I)/P :NEXT :FOR I=1 TO P
1240 A(I,0)=(1+AA)*Z(0,I)-AA*A(I,JH) :P(I)=A(I,0): NEXT :GOSUB *S
S: SR=SS
1250 IF SR<=A(0,JS) THEN *TREAT
1260 IF SR< A(0,JH) THEN GOSUB *CHANGE
1270 FOR I=1 TO P: A(I,0)=(1-BB)*Z(0,I)+BB*A(I,JH) :P(I)=A(I,0):
NEXT
1280 GOSUB *SS : SR=SS
1290 IF SR<A(0,JH) THEN GOSUB *CHANGE : GOTO *DISPLAY
1300 FOR K=1 TO P+1:FOR I=1 TO P:A(I,K)=(A(I,K)+A(I,JL))/2:P(I)=A
(I,K):NEXT
1310 GOSUB *SS : A(0,K)=SS :NEXT :GOTO *DISPLAY
1320 *TREAT: IF SR>=A(0,JL) THEN GOSUB *CHANGE : GOTO *DISPLAY
1330 FOR I=1 TO P: Z(1,I)=CC*A(I,0)+(1-CC)*Z(0,I):P(I)=Z(1,I):NEX
T
1340 GOSUB *SS : SL=SS: IF SL<SR THEN FOR I=1 TO P:A(I,JH)=Z(1,I)
:NEXT:A(0,JH)=SL ELSE GOSUB *CHANGE

```

```

1350 GOTO *DISPLAY
1360 *CHANGE : FOR I=1 TO P : A(I,JH)=A(I,0) : NEXT : A(0,JH)=SR
: RETURN
1370 *START '=====
=====
1380 SCREEN 2:CLS:ROLL 399:ROLL 1
1382 INPUT "1.single analysis 2.multi analysis ";X:IF X=2 THE
N RUN "SX1009"
1390 LOCATE 9,2:PRINT "◇◇ Nonlinear least squares fitting by Simp
lex method ◇◇"
1400 LOCATE 9,4:PRINT "Y = P(1)·exp(P(2)·X) + P(3)·exp(P(4)·X) +.
.. ."
1410 LOCATE 12,6:INPUT "Number of parameters(2,4,6)···4
";P
1412 IF P=0 THEN P=4:LOCATE 56,6:PRINT "4"
1420 N=500:'LOCATE 12,7:INPUT "Number of points = 500
OK";N
1430 'IF N=0 THEN N=500 :LOCATE 56,7:PRINT "500"
1440 LOCATE 12,8:INPUT "Weight of data(0,1,2)
";W
1450 LOCATE 12,9:INPUT "Max. error of initial parameters = 100% 0
K";ER
1460 IF ER=0 THEN ER=100:LOCATE 56,9:PRINT "100"
1462 LOCATE 12,10:INPUT "Convergence<0.00001
OK";PC:PRINT
1464 IF PC=0 THEN PC=.00001:LOCATE 56,10:PRINT "0.00001":PRINT
1470 DIM P(P),X(N+1),Y(N+1),A(P,P+1),Z(1,P),YL(N+1) : 'YL for grap
h
1480 ON P/2 GOTO *Y1,*Y2,*Y3
1490 *Y1 :DEF FNY=P(1)*EXP(P(2)*X(I)) :GOTO 1
520
1500 *Y2 :DEF FNY=P(1)*EXP(P(2)*X(I))+P(3)*EXP(P(4)*X(I)) :GOTO 1
520
1510 *Y3 :DEF FNY=P(1)*EXP(P(2)*X(I))+P(3)*EXP(P(4)*X(I))+P(5)*EX
P(P(6)*X(I))
1520 '===== INPUT DATA =====
=====
1530 INPUT "Set DATA disket on DRIVE-2 [RET]",ZZ
1540 FILES 2:PRINT :INPUT "file name ";F$ :F2$="2:"+F$
1550 OPEN F2$ FOR INPUT AS #1
1555 INPUT #1,N,SAMPT,DSP:INPUT #1,F$,B$(2)
1570 FOR I=1 TO N :INPUT #1,Y(I):NEXT :CLOSE #1
1580 FOR I=1 TO N :X(I)=I*SAMPT+DSP :YL(I)=Y(I):NEXT :Y(0)=1:YL
(0)=1
1590 '===== INPUT PARAMETER =====
=====
1640 FOR K=1 TO P/2
1642 LOCATE 9:INPUT "Estimation of P(I) 0.direct 1.graph";ZZ:IF
ZZ=1 GOTO 1645
1643 FOR I=K*2-1 TO K*2:LOCATE 9:PRINT "Initial P(";I;")=";:INPUT
P(I):NEXT:GOTO 1745

```

```

1645 IF K=1 THEN XYM=1:GOSUB *GRAPH:YMMAX=YMAX:YMMIN=YMIN
1650 FOR J=0 TO N:IF YL(J)<>0 THEN YL(J)=LOG(ABS(YL(J)))
1652 NEXT
1670 LO=1:XYM=0:GOSUB *GRAPH
1680 FOR J=0 TO 10:LI=50+J*48
1690 LINE(LI,20)-(LI,340),,,8738: LOCATE LI/8,12:PRINT J*10 :NEXT

1710 LOCATE 20,K*2:PRINT K;:INPUT "Log-linear portion from ? % ",
LP1(K)
1720 LOCATE 20:          INPUT "                      to ? % ",
LP2(K)
1730 IF LP1(K)>LP2(K) THEN SWAP LP1(K),LP2(K)
1740 GOSUB *LSM
1742 IF Y(1)<0 THEN P(K*2-1)=-P(K*2-1)
1745 FOR J=0 TO N: YL(J)=Y(J)-P(K*2-1)*EXP(P(K*2)*X(J)) :NEXT
1750 NEXT
1760 FOR I=0 TO N:YL(I)=Y(I):NEXT
1770 LO=0:XYM=0:GOSUB *GRAPH
1780 FOR I=1 TO P:LOCATE 20,1+I:PRINT "P(";I;")=";P(I);
1785 IF I MOD 2=0 THEN PRINT " t1/2(ms)=";LOG(2)/P(I)
1788 NEXT
1790 LOCATE 40,9:INPUT "0.START 1.NO 2.Lprint";ZZ
1800 IF ZZ=1 GOTO 1640 ELSE IF ZZ=2 GOTO 1861
1805 RANDOMIZE VAL(RIGHT$(TIMES$,2)) :ZZ=0
1810 TIMES$="00:00:00":GOSUB *SIMPLEX :Ts=TIMES$
1820 '===== OUTPUT =====
=====
1830 BEEP :K=P/2+1 :GOSUB *GRAPH
1850 FOR I=1 TO P:LOCATE 20,1+I:PRINT "P(";I;")=";P(I);
1855 IF I MOD 2=0 THEN PRINT " t1/2(s)=";LOG(2)/P(I)
1858 NEXT
1860 LOCATE 40:PRINT "SS=";SS, Ts :LOCATE 0,23:INPUT "1? ";X
1861 LPRINT "file ";Fs:FOR I=1 TO P:LPRINT "P(";I;")=";P(I);
1862 IF I MOD 2=0 THEN LPRINT " t1/2(s)=";LOG(2)/P(I)
1863 NEXT
1864 IF ZZ=0 THEN LPRINT "SS=";SS, Ts :LOCATE 0,22 ELSE 1790
1870 END
1880 *LSM : '=====
=====
1890 NN=0:X1=0:X2=0:Y1=0:Y2=0:XY=0
1900 FOR J=N*LP1(K)/100+1 TO N*LP2(K)/100 :X=X(J) : Y=YL(J)
1920 X1=X1+X: X2=X2+X^2: Y1=Y1+Y: Y2=Y2+Y^2: XY=XY+X*Y: NN=NN+1:
NEXT J
1940 VR=NN*XY-X1*Y1: VX=NN*X2-X1*X1: VY=NN*Y2-Y1*Y1
1950 P(K*2)=VR/VX : P(K*2-1)=EXP((Y1-P(K*2)*X1)/NN)
1960 RETURN
5000 *GRAPH : '=====
=====
5010 '----- Xmax & Ymax -----
5020 XMAX=-1E+30:XMIN=1E+30:YMAX=-1E+30:YMIN=1E+30:LOCATE 67:PRIN
T "Wait !"

```

```

5030 FOR J=0 TO N :X=X(J):Y=Y(J)
5040 IF XMAX<X THEN XMAX=X
5050 IF XMIN>X THEN XMIN=X
5060 IF YMAX<Y THEN YMAX=Y
5070 IF YMIN>Y THEN YMIN=Y
5080 NEXT J: IF XYM=1 THEN RETURN
5090 ' YMAX=YMAX+ABS(YMAX-YMIN)*.1
5100 IF YMIN<>0 THEN IF YMAX/YMIN>3 THEN YMIN=0
5110 IF XMIN<>0 THEN IF XMAX/XMIN>3 THEN XMIN=0
5120 IF YMIN<>0 THEN YMIN=YMIN-ABS(YMAX-YMIN)*.1
5130 YM1=INT(LOG(ABS(YMAX-YMIN))/LOG(10)):YM2=YMAX*10^-YM1:YM3=YM
IN*10^-YM1
5140 XM1=INT(LOG(ABS(XMAX-XMIN))/LOG(10)):XM2=XMAX*10^-XM1:XM3=XM
IN*10^-XM1
5150 SCREEN 2:CLS:ROLL 399:ROLL 1
5160 LINE(50,20)-(530,340),,B : 'X*Y=480*320
5170 IF LO=0 THEN A$=" S/10^" ELSE A$="ln(S)/10^"
5175 LOCATE 0,0:PRINT A$;YM1:FOR I=0 TO 10:LINE(45,20+I*32)-(50,2
0+I*32):LOCATE 0,(20+I*32)/16:PRINT USING "##.##";YM2-I*ABS(YM2-Y
M3)/10:NEXT
5180 LOCATE 29,23:PRINT"Time/10^";XM1;"s.":FOR I=0 TO 10:LINE(50+
I*48,340)-(50+I*48,345):LOCATE (50+I*48)/8-2,22:PRINT USING"##.##
";XM3+I*ABS(XM2-XM3)/10:NEXT
5182 LOCATE 15,0:PRINT "file,";F$;" : ";B$(2)
5190 '===== PLOT =====
=====
5200 FOR I=0 TO N
5210 X1=50+480*ABS((X(I)-XMIN)/(XMAX-XMIN))
5220 Y1=340-320*ABS((Y(I)-YMIN)/(YMAX-YMIN))
5230 IF N>100 THEN PSET(X1,Y1) ELSE CIRCLE(X1,Y1),2
5240 NEXT :IF K<=P/2 GOTO 5300
5250 FOR X=XMIN TO XMAX STEP (XMAX-XMIN)/100 :X(I)=X:Y(I)=FNY
5260 X1=50+480*ABS((X(I)-XMIN)/(XMAX-XMIN))
5270 Y1=340-320*ABS((Y(I)-YMIN)/(YMAX-YMIN))
5280 IF X>XMIN THEN LINE(X1,Y1)-(X2,Y2)
5290 X2=X1:Y2=Y1:NEXT
5300 RETURN

```

謝 辞

本研究は昭和58年4月から昭和60年12月にわたり、北海道大学薬学部薬品物理化学講座において行った研究をまとめたものである。

研究を進めるにあたり終始懇切な御指導を賜りました小島陽之助教授、加茂直樹助教授、ならびに上田哲男氏、高橋哲郎氏、田辺裕司氏に深く感謝の意を表します。また貴重なスピンプローブを御提供下さいました田辺裕司氏には感謝致します。さらに、スピンプローブの合成で、絶大なる協力をいただいた郷田純子嬢に感謝します。最後に、当講座の皆様には多くの御教示、激励をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

昭和61年3月

出 村 誠