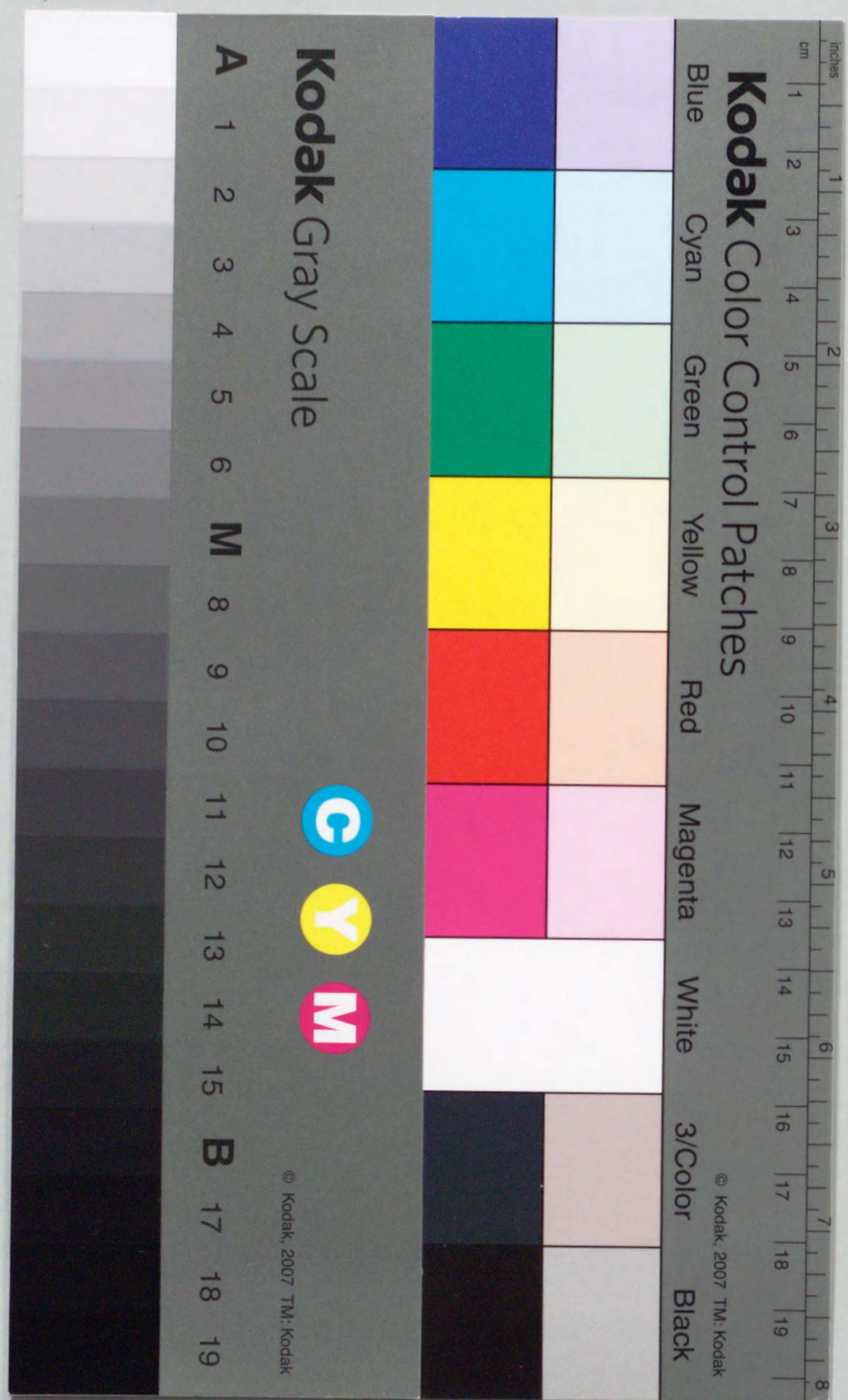


キャリアを含む有機液体膜システムを用いたアミノ酸
関連化合物の輸送に関する研究

竹島 繁雄



①

キャリアを含む有機液体膜システムを用いたアミノ酸
関連化合物の輸送に関する研究

竹島繁雄

目次

緒言	1
1 液体膜の種類	3
2 液体膜輸送の種類	5
3 生体膜モデルをしての液体膜	7
第1章 塩基性アミノ酸 (BAA) の輸送	10
第1節 pH に依存する各種アミノ酸の正味電荷	11
第2節 BAA 輸送におけるキャリアーの濃度位依存性	13
第3節 BAA の輸送に対する pH 依存性	15
第4節 種々の中性アミノ酸 (NAA) と BAA との液体膜輸送の比較	18
結論	21
第2章 ヒスチジン (His) - ヒスタミン (Hm) 混液からのヒスタミンの選択的輸送	23
第1節 BAA とその脱炭酸化合物の液体膜輸送	23
第2節 水相中の pH 変化と Hm および His の正味電荷	24
第3節 ジー 2 - エチルヘキシルコハク酸ナトリウム (AerosolOT, AOT) の濃度に依存した Hm の輸送挙動	25
第4節 His および Hm の液体膜輸送における pH 依存性	26
第5章 His - Hm 混液からの Hm の選択的分離輸送	30
結論	34

第3章 液体膜システムを利用したヒスタミンの合成と分離	3 6
第1節 ヒスチジンデカルボキシラーゼ (HD) 非存在下での 相2のpHに依存したHmの液体膜輸送	3 6
第2節 HD非存在下でのジ-2-エチルヘキシルリン酸 (EHP) 濃度に依存したHmの輸送	3 8
第3節 HDによるHmの生成と分離	4 0
結論	4 5
第4章 液体膜系におけるタウリン及び関連化合物の透過性	4 7
第1節 膜透過におけるいくつかの ω -アミノアルキルスルホン酸 (ω -AS)及び ω -アミノアルキルカルボン酸(ω -AA)の pH依存性	4 9
第2節 ω -AS及び ω -AAの輸送挙動に対するキャリアーの影響	5 0
第3節 各種 ω -AS及び ω -AAの液体膜輸送挙動	5 3
第4節 各種 ω -AS及び ω -AAの液体膜輸送挙動と分配係数の関係	5 6
結論	5 9
第5章 ポリアミン (PA) の液体膜との相互作用	6 0
第1節 PAの分配係数	6 1
第2節 キャリアー濃度をPAの輸送との関係	6 3
第3節 PA輸送に対する Ca^{2+} イオンの影響	6 5
第4節 PA輸送に対する種々のアルカリ土類金属イオンの影響	6 7
第5節 PA輸送に対する種々のアルカリ金属イオンの影響	6 9
結論	7 1

実験の部	
第1章	7 4
第2章	7 5
第3章	7 6
第4章	7 8
第5章	7 8
引用文献	8 0
謝辞	8 7

緒 言

分析機器の進歩とともに前処理としての分離や濃縮の操作は軽減されているとはいえ、分離濃縮は物質精製法として基礎的に重要である。目的物質の濃縮や妨害物質の除去などにイオン交換法や溶媒抽出法をはじめとして数多くの優れた分離方法が用いられている。イオン交換法は吸着と脱離、溶媒抽出法では抽出と逆抽出などのように、水溶液からの目的物質の補集とその分離回収など個別の操作が必要である。このような溶媒抽出において抽出と溶出を連続して行うために液体膜システムがある。これは、水に混じり合わない有機溶媒（液体膜）とこれを挟んだ2つの水相（相1と相2）を組み合わせ、相1と有機相では抽出操作が、有機相と相2では溶出操作が行われ、結果として目的物質が相1から相2へ有機相を介して輸送される。この操作を有効に行なうために、液体膜には多くの場合キャリアーとして被輸送物質と親和性の高い物質が含まれている。このため、これらの輸送をキャリアー輸送とも呼ばれている。たとえば、ヘモグロビンは酸素と高い親和性をもっており、これをキャリアーとした、液体膜による酸素の輸送が研究された。

液体膜を用いた物質輸送及びキャリアーの例を Table 1 に示す¹⁻⁴⁾。分離される物質として、金属イオンが多い^{5,6)}。これは、キレート試薬による分離が古くから行われてきたことから、液体膜への展開が容易であったためである。有機物質としては、有機酸（酢酸⁷⁾、エイコサペンタエン酸⁸⁾、アミノ酸（アミノ酸エステル、N-ベンゾイルアミノ酸⁹⁻¹⁵⁾、単糖類¹⁶⁾、ヌクレオシド^{17,18)}、ヌクレオチド¹⁹⁾がある。また酸素²⁰⁾、二酸化炭素²¹⁾、一酸化窒素²²⁾のような気体の輸送例、最近では、蛋白質、酵素など^{23,24)}の液体膜輸送の報告がある。

Table 1. The permeable species and carriers

Class	Permeable species	Carrier
Gas	O ₂	Hemoglobin
	NO	Fe ²⁺
	Olefins	Ag ⁺
Acid, Base	Acetic acid	TOPO
	Eicosahexaenoic acid	Ag ⁺
	Guanidium thiocyanate	Benzo-crownether
Metal ion	Cu ⁺	Bathocuproin, Thioether
	Na ⁺	Stearic acid
	Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺	
	Ranthanides	EHP
	Actinides	
	Alkali metals	
	Alkaline earth metals	Crown ether
	Ranthanides	
	Actinides	
	UO ₂ ²⁺	EHP, TOPO, Tertiary amine
	Pt ²⁺	Tertiary amine
	Cd ²⁺ , Cr ⁶⁺	Tertiary amine
		Quaternary ammonium ion
	Others	Amino acids
Lipophilic metal complex		
Crownether		
Monosaccharides, Nucleosides		Diphenyl borate
Nucleotides		DSD
Polypeptide, Protein		Aerosol OT

EHP: di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid

TOPO: trioctylphosphineoxide

DNNS: dinonylnaphthalene sulfonic acid

Tertiary amine: trioctylamine, tridodecylamine

Quaternary ammonium ion: methyltrioctylammonium chloride

DSD: N,N'-distearyl-1,4-diazobicyclo[2,2,2] octane

Aerosol OT: sodium di-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate

1) 液体膜の種類

今日用いられている液体膜は大きく3種に分けられる。

- a) バルク液体膜 (bulk liquid membrane)
- b) 支持型液体膜 (含浸液体膜) (supported liquid membrane)
- c) 乳化液体膜 (emulsion liquid membrane)

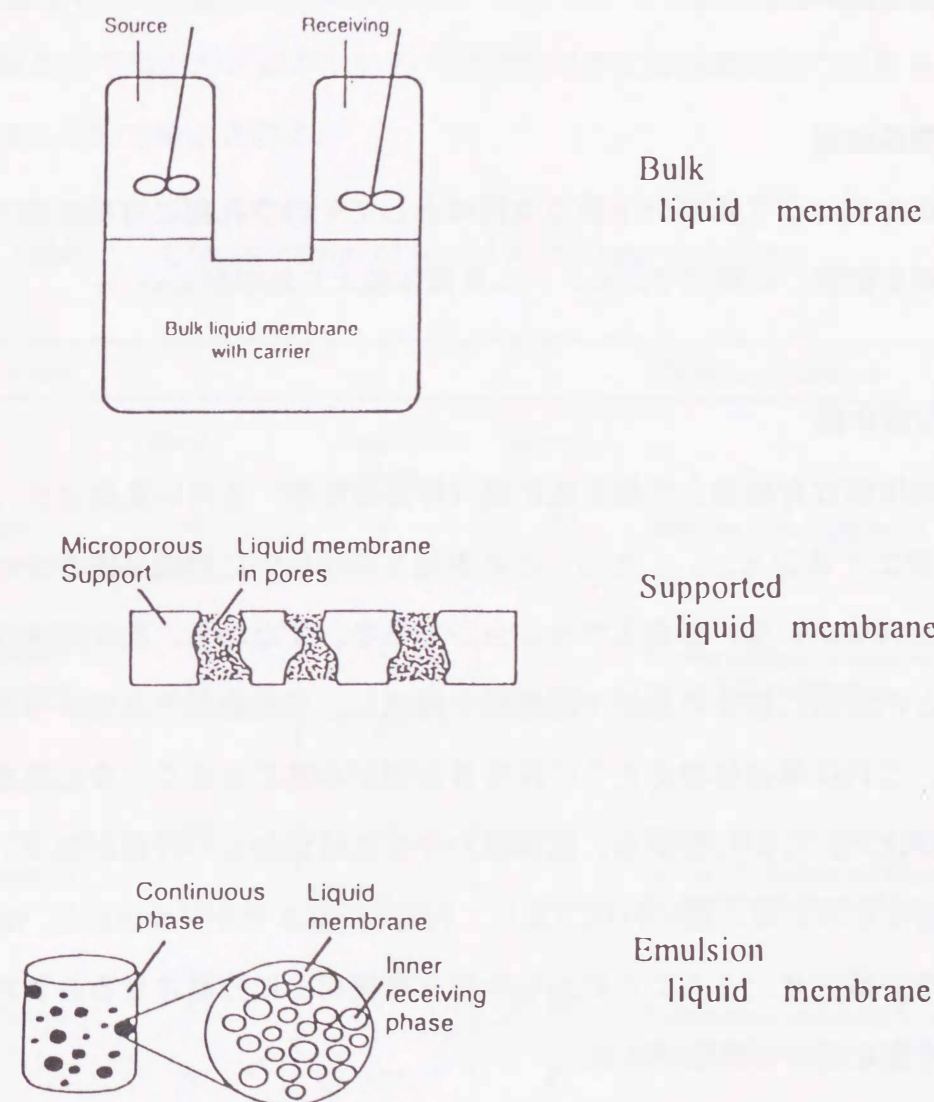


Fig. 1. Classification of liquid membrane

a) バルク液体膜

液体膜システムとして最も簡単なものは、Fig. 1 に示すバルク液体膜である。このシステムでは、膜の液相が相 1 と相 2 に比べ大きな容積を占めるため、抽出された液体膜中の輸送物質が十分に逆抽出されず、また輸送に時間がかかり、効率が悪い。しかし、装置が簡単なので、実験室での基礎的な実験には有用である。本研究はこのシステムを用いた。

b) 支持型液体膜

支持型液体膜は多孔質高分子膜を支持体としてその空孔部に有機溶媒を含浸させ両側に水相を配置した構成である。バルク液体膜より効率がよい。

c) 乳化型液体膜

乳化型液体膜は有機相と水相を乳化剤（界面活性剤）を用い乳化させ（water-in-oil, W/O 型エマルジョン）、さらにこれを第 3 の水相中に懸濁分散させた water-in-oil-in-water (W/O/W 型) 多相エマルジョンである。すなわち、乳化剤を含む有機相が外水相と内水相に挟まれた形で液体膜を構成し、目的物が外水相から内水相へ輸送される。これは単位体積あたりの反応界面積が非常に大きく、また膜厚が薄いので、効率がよい。しかしながら、液体膜の作成には煩わしい行程があり、また目的物を取り出すためには、逆の行程つまり W/O/W 型エマルジョンから W/O 型エマルジョンを分離させ、さらにこれから水相と有機相とに分離させる必要がある。また液体膜の安定性にも問題がある。

2) 液体膜輸送の種類

a) 受動輸送 (Passive transport)

これはキャリアーを使用しない場合であって、相 1 中の A は液体膜に溶解、拡散して相 2 へ移動する。この単純拡散系では被輸送物質の膜液相への溶解度、拡散係数（有機相中の非輸送物資の移動速度）の差によって選択性が得られるが、拡散係数が物質によってほとんど差がないので選択性は主に溶解度の差で決まる。炭化水素²⁹⁾などはこの形で輸送される。

Table 2. Classification of liquid membrane transport

Class	Example of transport			
	phase I	organic phase	phase II	
Passive transport	A1 →	→ A →	→ A2	Transport of carbohydrates
Facilitated transport	A1 →	↙ C ↘ ↘ AC ↙	→ A2	Carrier mediated transport or O ₂ , NO and Olefins
Counter transport	A1 ↘ B1 ↙	↙ BC ↘ ↘ AC ↙	↙ A2 ↘ B2	Transport of metal ions by acidic carriers. Transport of anions by quaternary ammonium ions
Co-transport	A1 ↘ B1 ↙	↙ C ↘ ↘ ABC ↙	↙ A2 ↘ B2	Transport of amino acids, alkali metals and alkaline earth metals

A: Permeable substance, B: Co-substance, C: Carrier
A1, B1: concentrations in phase I
A2, B2: concentrations in phase II

b) 促進輸送 (Facilitated transport)

有機相にキャリアーを加えると、被輸送物質は積極的に取り込まれ、被輸送物質自身の拡散に加えてキャリアーとの複合体の輸送があるので、物質の輸送はその分だけ促進される。このような輸送を、一般に促進輸送と呼ばれる。

ヘモグロビンをキャリアーとする O_2 の促進輸送²⁰⁾ や Ag^+ によるエチレン、プロピレンなどのアルケンを選択的に促進輸送され、アルケン-アルカン混合物からの分離輸送が可能である²⁶⁾。

c) 対向輸送 (Counter transport) と d) 並列輸送 (Co-transport)

受動輸送や促進輸送では物質は濃度の高い側から低い側に濃度勾配によって輸送されるが、濃度差がなくなると、物質は輸送されなくなる。Table 2 のように相 1 と相 2 に A、B が共存するときを考えると、両相の化学ポテンシャルの差は

$$\begin{aligned}\mu_A &= RT \ln(A_2/A_1) \\ \mu_B &= RT \ln(B_2/B_1)\end{aligned}$$

で表される。

平衡状態では $\mu_A = \mu_B$ であるので、 $(A_2/A_1) = (B_2/B_1)$ が成立する。 $\mu_B > \mu_A > 0$ 、すなわち $(B_2/B_1) > (A_2/A_1) > 1$ のとき B はその濃度勾配に従って相 2 から相 1 へ移動し、この拡散に駆動されて A はその濃度に逆らって相 1 から相 2 に輸送される。逆に $\mu_A > \mu_B > 0$ すなわち $(A_2/A_1) > (B_2/B_1) > 1$ のときは A が濃度勾配に従って相 2 から相 1 に移動し、B は A に駆動されて相 1 から相 2 へ輸送される。このように反対相側からのイオン輸送を駆動力とした輸送を対向輸送という。本研究の、液体膜輸送のメカニズムはこの対向輸送によるものである。ここで、反対相側から移動し駆動力をもたらすイオンをアンチポートカチオンあるいはアンチポートアニオンと呼ぶ。

また相 1 に A、B が共存する時 B の相 2 への輸送力を駆動力とし A が相 2 へ濃度勾配に逆らって輸送する場合を並列輸送という。

対向輸送として、Moore と Schechter は Fig. 2. に示すような、ステアリン酸を少量含むペンタノールの液体膜系を用い、ナトリウムイオンの輸送を示した²⁷⁾。この場合、ステアリン酸がキャリアーとなり、ナトリウムイオンと水素イオンとがキャリアーとの結合力の異なることを利用している。

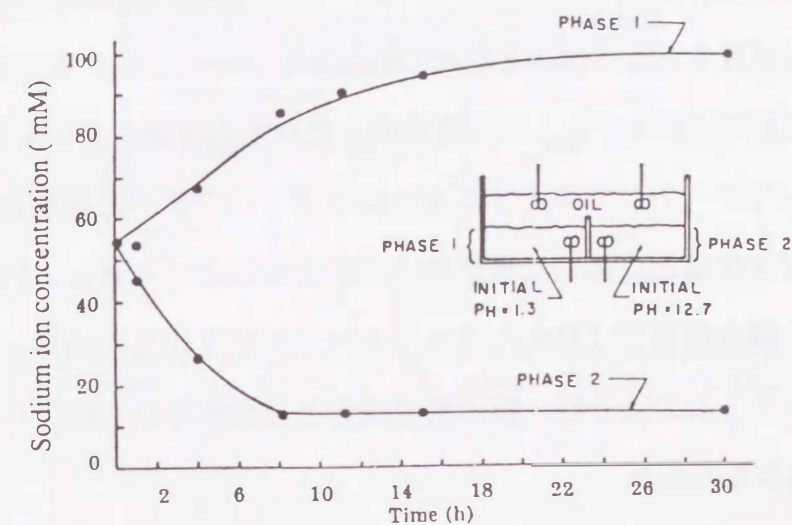


Fig. 2. Na^+ concentration as a function of time²⁷⁾

この結果、ナトリウムイオンは相 2 から相 1 へ運ばれると同時に水素イオンは相 1 から相 2 へ運ばれる。

3) 生体膜モデルとしての液体膜

生体関連物質のなかで有機物の多くはイオン性物質である。これらは常にカチオンとして存在する無機イオンとは異なり、溶媒の pH によりイオン解離を起こし正や負に荷電する。このためにこれらの輸送を考える場合、アニオン性物質の輸送にはカチオン性キャリアー、又カチオン性物質ではアニオン性キャリアーを用いることにより可能となる。

たとえば、イオン性物質であるアミノ酸は、高い pH ではアニオンに、低い pH ではカチオンになり、それぞれ反対電荷のキャリアーにより液体膜輸送が可能となる。これら連続的に分離を行わせるように考案した液体膜システムは、適当にキャリアーを選択することにより、物質の認識、選択的輸送、能動輸送など、いわゆる生体膜と類似の機能を有するシステムに応用されるようになった。

液体膜システムは単に純化学的な分離手段としてばかりでなく、液体膜を生体膜のモデルとして生物化学面にも利用されている^{28,29)}。被輸送物質は、特異性の高い輸送能を持った蛋白質やポリペプチドなどの輸送キャリアーと複合体を形成したり、膜蛋白質によって生成されるチャンネルを通過したりする機構により膜を透過する。この際、輸送キャリアーとして作用する蛋白質やポリペプチドと被輸送物質との間の物理化学的な相互作用と立体的な構造特性の組合せによって著しい特異性が発現される。生体膜の輸送機構では膜内のキャリアーとの相互作用の結果、輸送可能となる。また、ポリアミンのように、膜の構成成分と結合することにより、生理反応に関与している場合もある³⁰⁾。

従って、膜構成成分と被輸送物質との相互作用を研究することは非常に意義があり、液体膜が利用できると考えた。

有機液体膜システム (Fig.3) を用いた本研究を大別すると、次の二部から成る。

第 1 部は生体関連物質の分離輸送に関する研究で

a) 塩基性アミノ酸の液体膜輸送、b) ヒスチジン、ヒスタミン混合液からヒスタミンの選択的輸送、および c) 液体膜を利用したヒスタミンの合成と分離、からなる

第 2 部は生体膜モデルを意識した生体成分の輸送と構造との関係を論じたもので

a) 液体膜におけるタウリン及び関連化合物の透過性、b) 液体膜システムを用いたポリアミンと液体膜との相互作用、について述べる。

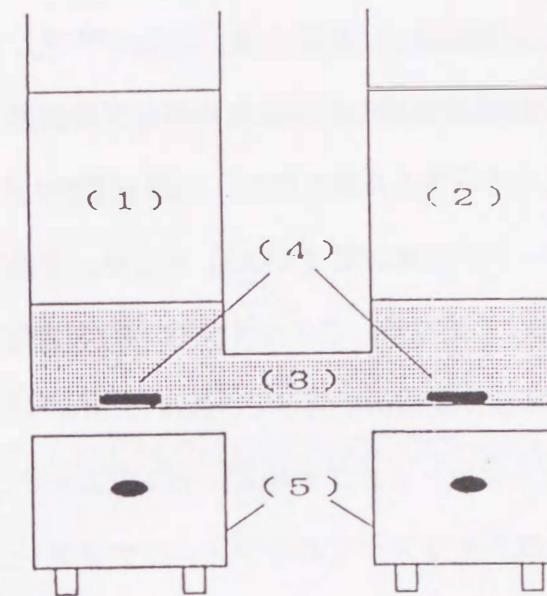


Fig. 3. Schematic diagram of an organic liquid membrane system. (1) phase I, (2) phase II, (3) organic phase (4) spinners, (5) magnetic stirrers.

輸送挙動は Residual ratio (RR) (1)、Transported ratio (TR) (2) の値を用い検討した。

$$RR = C_{1t} / C_i \times 100 \quad \text{----- (1)}$$

$$TR = C_{2t} / C_i \times 100 \quad \text{----- (2)}$$

ここで、 C_i はサンプルの初期濃度、そして C_{1t} 及び C_{2t} は t 時間反応後のそれぞれ相 1、相 2 におけるサンプルの濃度を示している。

第1章 塩基性アミノ酸の輸送

液体膜を用いた輸送実験の対象物質には金属イオンが多い⁵⁶³¹⁻³⁷。また、有機化合物としては、アミノ酸がユニークな性質を持っているため被輸送物質としてよく用いられている。アミノ酸がアミノ基とカルボキシル基を持ち、中性 pH ではアンモニウムカチオン型 ($-\text{NH}_3^+$) とカルボキシレートアニオン型 ($-\text{COO}^-$) をとり、中性アミノ酸 (NAA) の場合は双性イオン ($^+\text{NH}_3\text{-R-COO}^-$) となる。このイオンは pH の変化でアニオン型にもカチオン型にもなる。アミノ酸の液体膜輸送に関して、Behr と Lehn⁹⁾ の先駆的な研究がある。カチオン性キャリアーであるメチルトリオクチルアンモニウムイオンによりアニオン型のアミノ酸が、またアニオン性キャリアーであるジニルナフタレンスルホン酸イオンによりカチオン型のアミノ酸が輸送された。そしてこれらの輸送は濃度勾配に逆らった輸送であり、輸送を遂行するにはアニオン型あるいはカチオン型にするために強酸 (0.1 M HCl) や強アルカリ (0.1 M NaOH) の条件を必要とした。また他の方法として、アミノ基及びカルボキシル基をそれぞれベンゾイル化、エステル化し、アニオン型やカチオン型にして輸送実験が行われた¹⁷⁾。しかしながら、これまで液体膜輸送に用いたアミノ酸及びその誘導体は脂溶性が高いものが用いられた。しかし、親水性が高く、側鎖に塩基性官能基を持つ塩基性アミノ酸 (BAA) は生体にとって重要な物質の前駆体であり、生理的に重要な物質であるにもかかわらず、液体膜輸送に対する報告はほとんどなかった

最近、Hatton³⁸⁾ はジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) を含むイソオクタンによるアルギニンの抽出実験を行い、水相の pH が低くなるほど、つまり正の正味電荷が増すほどその抽出量が増大することを示した。

生体膜輸送において、NAA と BAA とでは異なる挙動を示す。その相違が塩基性基の有無に関係していることは、十分に考えられることである。

このことを検証する目的で本研究では NAA と BAA と輸送をモデル膜としてバルク液体膜を用い検討した。

BAA としてアルギニン (Arg)、ヒスチジン (His)、オルニチン (Orn) を用いた。実験で用いたアミノ酸は全て L-体、液体膜を形成する有機相はクロロホルム、キャリアーは AOT (Fig. 1-1) を用いた。

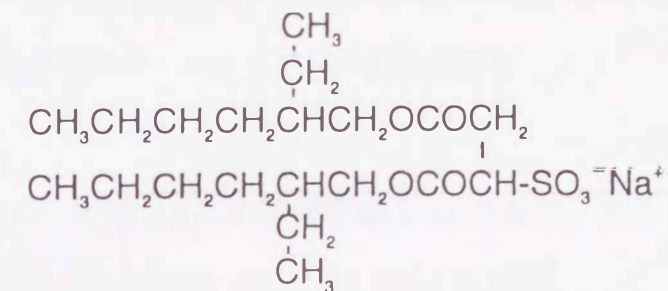


Fig. 1-1 The structure of sodium di-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (Aerosol OT, AOT)

第1節 pH に依存する各種アミノ酸の正味電荷

アミノ酸は pH により正味電荷が変化する。その様子を Fig. 1-2 に示す。アミノ酸のカルボキシル基の酸解離定数 ($\text{pK}_a(\text{COOH})$) およびアミノ基のそれ ($\text{pK}_a(\text{NH}_3^+)$) はそれぞれおよそ 2 と 9 である³⁹⁾。又今回用いた BAA の pK_a を Table 1-1 に示す。

pH 1 ではカルボキシル基は $-\text{COOH}$ 型、一方、アミノ基は $-\text{NH}_3^+$ 型になるため NAA の正味電荷はおおよそ +1、BAA のそれは +2 となる。

pH 2 ではカルボキシル基がほぼ 50% 解離しているため、NAA ではおよそ +0.5、BAA ではおよそ +1.5 となる。

pH 3 ではほぼ NAA のカルボキシル基は少量 (約 10%) ながら ($-\text{COOH}$) 体が存在し、NAA の正味電荷はおおよそ +0.1、BAA のそれはおよそ +1.1 となる。

Table 1-1 The proton dissociation constants (pKa) of basic amino acids

Amino acid	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
Arginine*	1.96 ^{a)}	9.02 ^{b)}	12.07 (guanidino)
Histidine**	1.96 ^{a)}	6.12(imidazole)	9.07 ^{b)}
Ornithine*	1.75 ^{a)}	9.14 ^{b)}	10.67(ε-amino)

The temperature was 25°C. a) carboxyl group; b) α-amino group

*: ref. 41; **: ref. 40

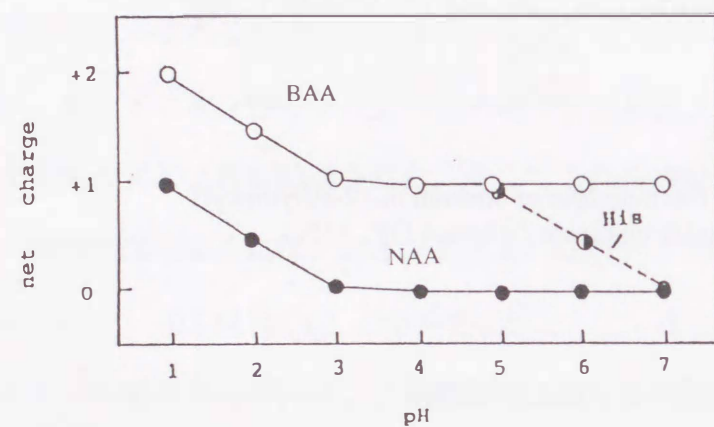


Fig. 1-2 Net charges of BAA and NAA at various pH conditions. pKa values of carboxyl and amino groups of NAA are 2 and 9, respectively.

pH4 ~ 5 では NAA の正味電荷は 0, BAA のそれは +1.0 である。pH6 になると His のイミダゾール基の部分的プロトン解離が生じ (イミダゾール基の pKa = 6.12)⁴⁰、His の正味電荷はおよそ +0.5、他の BAA のそれは +1 となる。pH7 では、His の正味電荷は、ほぼ +0.1、他の BAA のそれは依然 +1 となる。

Orn の ε-アミノ基の pKa が 10.67⁴¹⁾ で、pH11 以上の pH ではその正味電荷はほぼ -1 となる。また、Arg ではグアニジル基の pKa は 12.07⁴¹⁾ と極めて高く、0.1 M NaOH などの強アルカリ性で初めてその正味電荷が -1 となる。

このように、Arg は強い塩基性の側鎖があるので pH にはあまり影響されず通常の pH では、カチオン体として存在する。

以上の結果をもとに BAA の液体膜輸送について詳細に検討し、さらに他の NAA と比較した。

第2節 BAA 輸送におけるキャリアーの濃度依存性

pH3 の条件下では BAA の正味電荷は +1 となり、アニオン性の AOT と静電結合し、液体膜を形成する有機相へ移行すると考えられる。

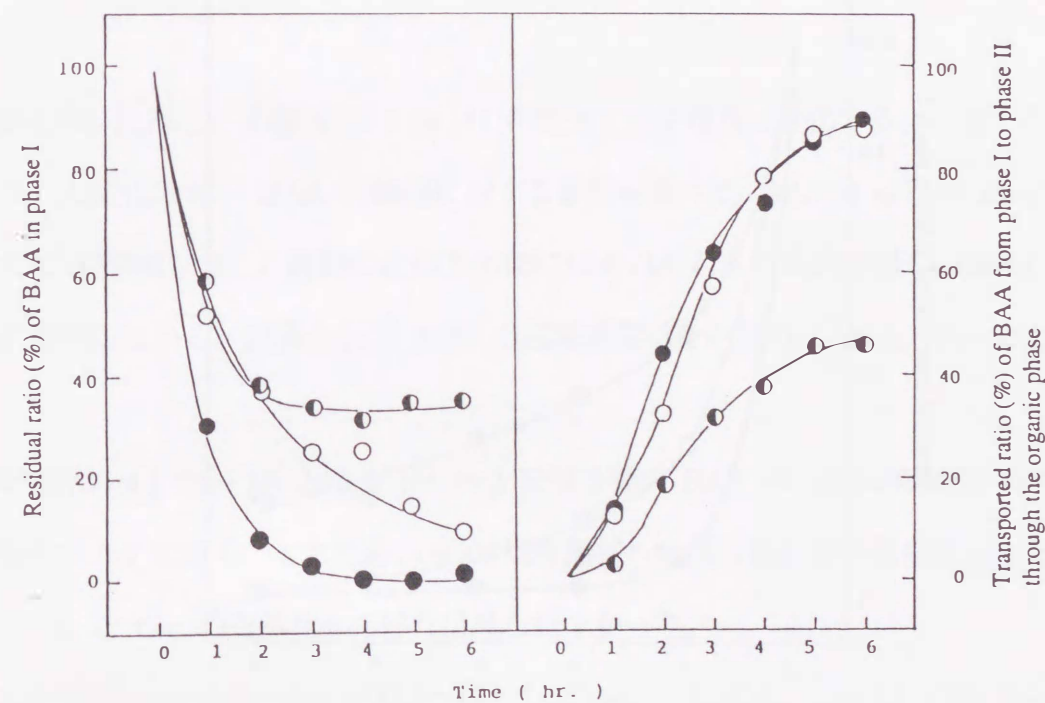


Fig. 1-3. The time-dependent transport of BAA. The initial concentrations of BAA in phase I and AOT in the organic phase were 1 and 4 mM, respectively. The pH values of phases I and II were 3 and 10, respectively. Both residual and transported ratios of BAA are plotted against the reaction time.

● Arg, ○ His, ◐ Orn

そこで、相1 と相2 の pH をそれぞれ 3 と 10 とし、AOT 4 mM を有機相に加え、BAA の輸送挙動を調べた。試料の濃度は 1 mM とし、時間ゼロで相1に加えた。Fig.1-3 では反応時間に対し縦軸の左側には Residual Ratio、RR(%), 右側には Transported Ratio、TR(%)を示す。

Arg は 4 時間後、相1から、すべて有機相へ移行した。一方 His や Orn では、6 時間後でも相1に一部残存した。(His の RR 値=約 10%、Orn の RR 値=約 40%)。また有機相を介して相1から相2への輸送量は相1から有機相への移行量に依存して増加した。そこで、AOT の濃度を変化させ、BAA の有機相への移行性を調べた。

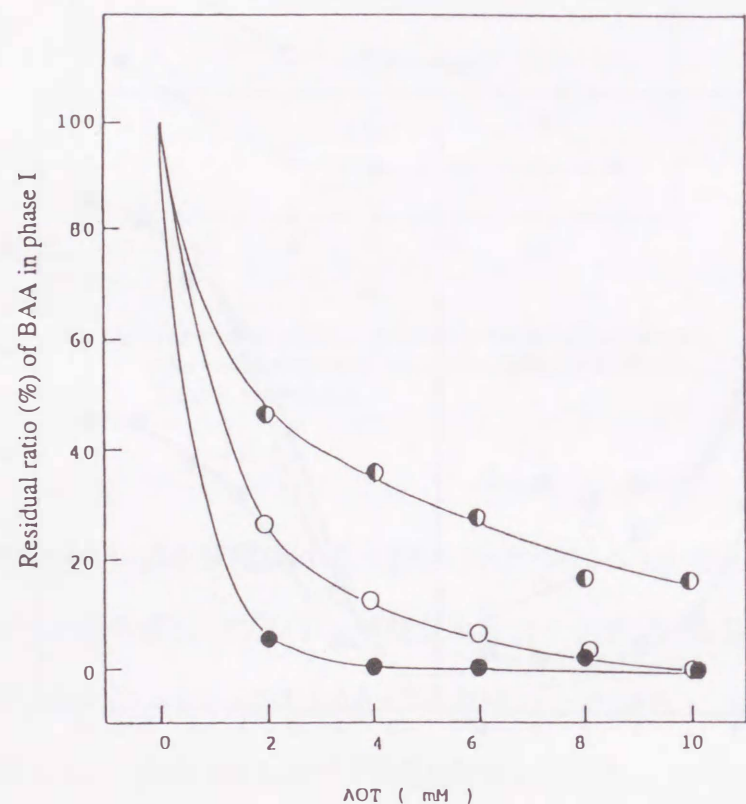


Fig. 1-4 The effect of the AOT concentration on the extraction of BAA from phase I to the organic phase. The initial concentration of BAA was 1 mM. The pH values of phases I and II were 3 and 10, respectively. Data were obtained after 6 hours of reaction. The residual ratio of BAA was plotted against the concentration of AOT.
● Arg, ○ His, ◐ Orn

Fig. 1-4 は AOT の濃度に対し、6 時間反応後の RR 値を示す。相1 と 2 の pH はそれぞれ 3 と 10 とした。Arg では AOT 2 mM ですでに RR 値が約 5% とほぼ全量有機相へ移行している。His は 約 25%, Orn では約 45% 相1に残存している。

さらに AOT 濃度を増加させると His および Orn の有機相への移行量は増大し 10 mM では His は 100% 有機相へ移行した。一方、Orn はこの濃度でも相1に 約 20% 残存した。以上の結果から液体膜である有機相への移行しやすさは Arg > His > Orn の順であった。従って、BAA の AOT への親和性は Arg > His > Orn の順に低くなっていることが判明した。

第3節 BAA の輸送に対する pH 依存性

1 節に示した様に、3 種の BAA は pH の変化で正味電荷が変化する。相1の pH を 1 ~ 7.2 と変化させ、BAA の輸送に対する影響を調べた。相2の pH は 10 とした。Fig.1-5 では横軸に pH、縦軸の左側と右側にはそれぞれ 6 時間反応後の RR(%) および TR(%) を示している。試料および AOT の初期濃度はそれぞれ 1 mM、10 mM であった。

正味電荷が +2 ~ +1.5 となる pH 1~2 では 3 種の BAA は 100% 有機相へ移行した。正味電荷が +1 になる 4 より高い pH では有機相への移行量に差が見られ、pH 6 ~ 7.2 では、His と Orn の有機相への移行は見られなかった。

pH 7.2 では Arg は約 40% 有機相へ移行している。これは、pH 7.2 では His の正味電荷が 0 となるので、移行し難いことで説明できる。一方 Arg と Orn では正味電荷が両方 +1 であるにもかかわらず、有機相への移行性に差が見られた。

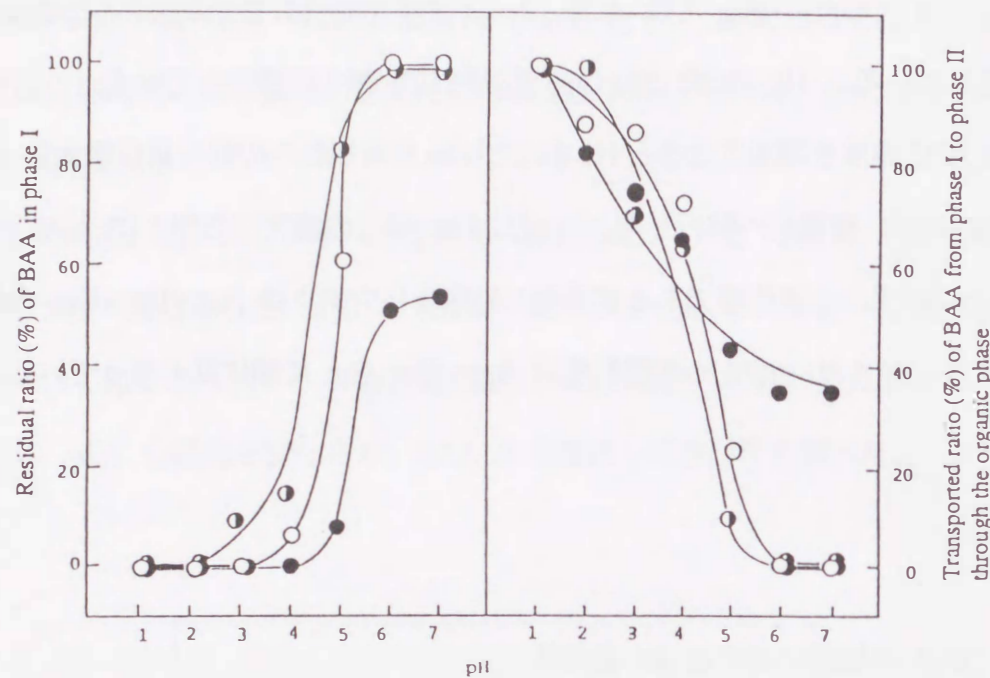


Fig. 1-5 The pH dependent transport of BAA. The initial concentrations of BAA and AOT were 1 and 10 mM. The pH value of phase II was 10 and that of phase I was changed. Data were obtained after 6 hours of reaction. Both residual and transported ratios were plotted against the pH value.
● Arg, ○ His, ● Om

有機相への移行しやすさは、その物質自体の脂溶性（分配係数）に影響される。

分配係数は水相と水と混じり合わない有機溶媒（オクタノールがよく用いられる）間で分配平衡させた後の両相間の濃度の比つまり、 $P = (\text{オクタノール中の試料濃度} / \text{水相中の試料濃度})$ である^{42~44}。

Arg と Om のその塩基が荷電した状態での分配係数の対数値は Arg (-4.20), Orn (-4.22)⁴⁵でほとんど同じである。このことから、Arg と Om との有機相への移行量の相違は、AOT との親和力の差によって生ずるものと考えられ、Arg は AOT との強い親和性を示すことが分かった。一方、有機相へ移行した量の約 70~100% が相 2 へ移行することを確認した。

次に、相 2 の pH と、有機相を介して相 1 から相 2 への輸送挙動を検討するため pH を種々変えた際の 6 時間反応後の TR(%) をプロットした (Fig. 1-6)。相 1 の pH は 3、試料および AOT の濃度はそれぞれ 1 mM、10 mM であった。His、Arg そして Om の TR 値は相 2 の pH に関係なくほぼ一定となり、それぞれおよそ 80%、70% そして 60% であった。

以上の結果、相 2 への輸送は相 2 の pH には影響されず、相 2 中のアンチポートカチオンと有機相中の BAA との交換反応が相 2 への移行を促進することが分かった。

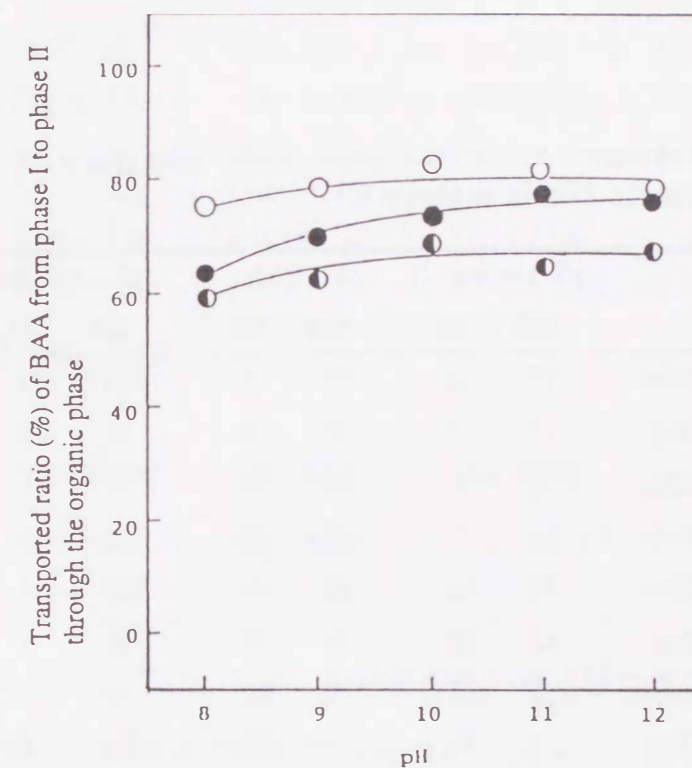


Fig. 1-6 The release of BAA from the organic phase to phase II. The initial concentrations of BAA and AOT were 1 and 10 mM, respectively. The pH value of phase I was 3 and that of phase II was changed. Data were obtained after 6 hours of reaction. The transported ratio of BAA was plotted against the pH value.
● Arg, ○ His, ● Om

第4節 種々の NAA と BAA との液体膜輸送の比較

第3節で示したように、pH 変化により BAA の輸送挙動が異なり、その原因に正味電荷の関係していることが明らかになった。このような現象が他のアミノ酸に対しても成り立つかどうかを、種々の NAA を用いて調べた。相1の pH を 1、3 そして 5 と変化させた時の輸送データを BAA のそれとともに Table 1-2 にまとめた。ここで相2の pH を 10 とし、試料および AOT の初期濃度をそれぞれ 1 mM、4 mM とした。表中のデータは 6 時間反応後の RR(%) 値 および TR(%) 値 を示す。参考に、疎水性のパラメータとして正味電荷 0 のときの分配係数 (BAA では塩基性基が荷電状態) の対数値を列記した。

Table 1-2. The transport of various amino acids into phase II through the organic liquid membrane .

Amino acid	pH 1 (phase I)	pH 3 (phase I)		pH 5 (phase I)		log P	
		RR%	TR%	RR%	TR%		RR%
Glycine (Gly)	87	13	97	0	100	0	-3.03
Threonine (Thr)	87	12	92	0	97	0	-2.91*
Alanine (Ala)	78	19	86	13	97	0	-2.74
Valine (Val)	21	77	53	44	100	0	-2.10
Methionine (Met)	19	84	46	59	100	0	-1.84*
Leucine (Leu)	12	88	15	82	91	5	-1.71
Phenylalanine (Phe)	0	97	8	88	89	9	-1.43
Tryptophan (Trp)	0	88	3	94	84	7	-1.04
Ornithine (Orn)	0	88	37	46	84	11	-4.22*
Histidine (His)	0	95	13	86	72	24	-4.20*
Arginine (Arg)	0	94	0	87	49	43	-4.15*

The initial concentrations of amino acid and AOT were 1 and 4 mM, respectively. The pH value of phase II was 10.0 and that of phase I was changed. Reproducibility: less than $\pm 15\%$. *: ref. 45, other log P: ref. 42)

pH 1 では、NAA の正味電荷は +1、BAA のそれは +2 で、全てのアミノ酸が有機相へ移行している。そして NAA では有機相への移行量は疎水性の高いほど増大した。pH 3 になると、NAA の正味電荷はおよそ +0.1 で 正の電荷がわずかに存在しているため、疎水性がそれほど高くない Ala でも 14% 有機相への移行が見られた。また BAA では 60% 以上有機相へ移行した。pH 3 における、NAA および BAA の有機相への移行量は以下ようになった。ここで、() 内の値は、相1から有機相への移行率 (100-RR) 値で示した。またそれぞれの分配係数の対数値も示した。

NAA における比較 (pH 3)

移行率 : Trp (97%) > Phe (92%) > Leu (85) > Met (54%) > Val (47%) > Ala (14%) > Thr (8%) > Gly (3%)

分配係数の対数値 : Trp (-1.04) > Phe (-1.43) > Leu (-1.71) > Met (-1.84) > Val (-2.10) > Ala (-2.74) > Thr (-2.91) > Gly (-3.03)^{42,45)}

BAA における比較 (pH 3)

抽出率 : Arg (100%) > His (87%) > Orn (63%)

分配係数の対数値 : His (-4.15) > Arg (-4.20) > Orn (-4.22)⁴⁵⁾

このように NAA においては、脂溶性が高いほど移行量は増大している。pH 3 における移行率と分配係数の関係を、Fig. 1-7 に示す。NAA の抽出量とその分配係数は直線関係にあり、pH 3 つまり正味電荷がおよそ +0.1 とほぼ一定の正味電荷をもっている NAA では有機相への移行量はこれらの分配係数に依存していることが明らかになった。

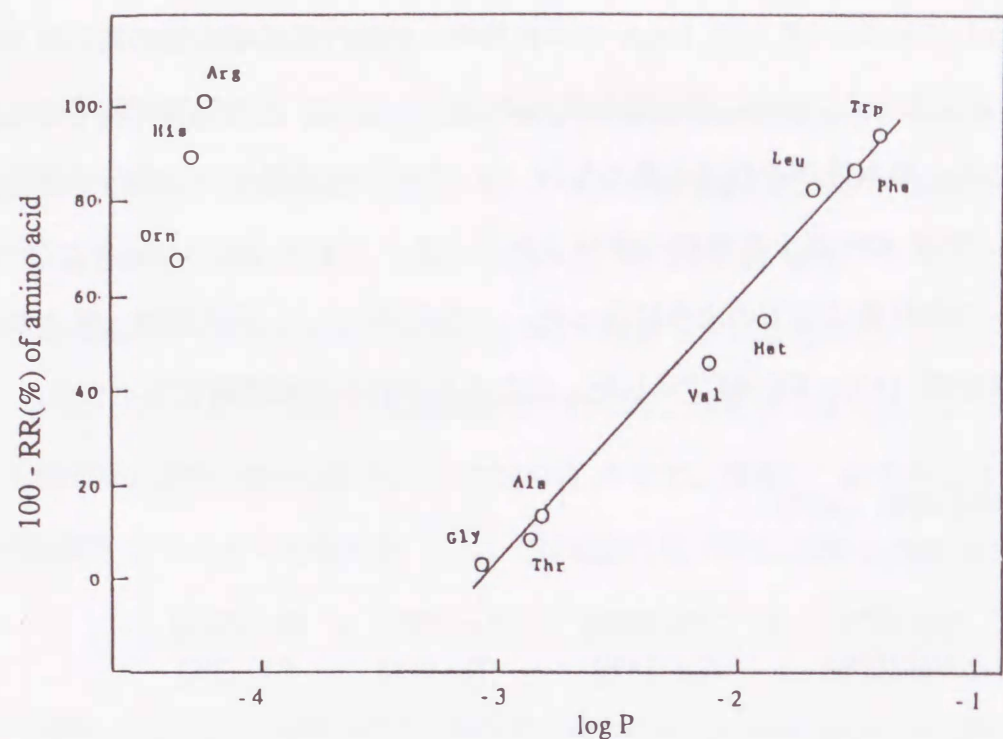


Fig. 1-7 Relationship between extraction ratio of amino acid and partition coefficient. The initial concentrations of amino acid and AOT were 1 and 4 mM, respectively. The pH values of phases I and II were 3 and 10, respectively. Extraction ratio is 100-RR. Data in Table 1-2 are plotted.

一方、pH 3 でその正味電荷がおおよそ +1.1 である BAA では、これらの分配係数はほぼ等しいが、移行率は異なっていた。このようなことから正に荷電した側鎖と AOT との親和性に相違のあることが示唆された。pH 5 では正味電荷がゼロになる NAA では脂溶性の高い Leu、Phe、Trp 以外は有機相へ移行しなかった。BAA ではこの pH でも有機相への移行が可能で、移行量は Trp と同等かそれよりも多かった。これらの結果、BAA は NAA とは輸送挙動が異なり、この原因は主に正味電荷の差に基づくと考えられる。

生理的 pH では BAA (Arg, Orn) は正の電荷を有し、NAA とは輸送挙動が異なる。AOT を含む液体膜による BAA 輸送システムでは正の電荷を認識する部位の存在が示唆される。

示唆される。アミノ酸の生体膜輸送は BAA と NAA で異なるのは、正の荷電の差に基づくものと考えられている。このような相違が今回検討した液体膜モデルでも見出された。今後、キャリアーを選択することにより、より生体に近いモデルの構築が可能であろう。

また、分析化学的には、分離輸送の観点からみると、ほとんどの NAA と BAA との分離輸送の可能性を示唆する結果を得た。予備実験であるが、カチオン性キャリアーであるメチルトリオクチルアンモニウム塩を用い相 1 および相 2 の pH をそれぞれ 10、5 とすると、Leu、Phe、Trp は輸送された。一方、His、Arg はほとんど輸送されなかった。このことは今後さらにキャリアー、pH、有機溶媒などを選択することにより、より厳密な BAA の分離輸送が可能となることが分かった。

結論

有機液体膜輸送の研究で生体関連物質としてアミノ酸はもっともよく用いられている。しかしながら、用いられているアミノ酸は脂溶性の高いもの (Phe、Trp、Leu など) で、かつ側鎖にイオン性基をもたない中性アミノ酸 (NAA) がほとんどであった。これらのアミノ酸は中性 pH 領域では双極子イオンとなっており、強アルカリ性 (0.1 M NaOH) や強酸性 (0.1 M HCl) の条件で、正味電荷を正や負にして始めて液体膜輸送が可能である。

一方、側鎖に塩基性基を有する塩基性アミノ酸 (BAA) は正味電荷が正になる pH が NAA より高い領域にあるため、NAA とは異なること輸送機序が予想された。そこで、BAA の性質に注目し、液体膜輸送を試みた。キャリアーとして、アニオン性の AOT を用いたところ pH 1 では、用いたアミノ酸すべてが、輸送された。正味電荷はほぼゼロとなる中性アミノ酸では、相 1 から液体膜相 (有機相) への移行量は、疎水性が高いものほど増大し、親水性の高いグリシンなどの輸送は、困難で

あった。一方、BAA では、+1 の電荷を有し、それらの輸送量は 50% 以上であった。pH 5 になると、Leu、Phe、Trp（これらの輸送量は 10% 以下）を除くほとんどの NAA の輸送が困難となった。一方、BAA では、Om、His、Arg の輸送量はそれぞれ 11%、24%、43% であった。ここで注目すべきことは、同じ正味電荷で、かつ分配係数がほとんど同じである BAA 間で、輸送量が異なることである。これは、それぞれのイオン化している側鎖とキャリアーとの親和性の相違が、このような差になって現れていると考えられる。通常、BAA の生体膜輸送は NAA 輸送体では輸送されず、特異的な輸送体が存在するといわれている。このように、生体膜輸送における NAA と BAA の相違が液体膜輸送においても認められ、BAA の輸送における側鎖の重要性が分かった。

第2章 ヒスチジン-ヒスタミン混液からのヒスタミンの選択的分離輸送

液体膜を分離手段に利用することは一つ大きな流れである。イオン性化合物の分離輸送には、キャリアーに対する親和性の差異が利用される。例えば金属イオンでは、キャリアーに対する錯体安定度の差にもとづき輸送に選択性が見られ、数多くの研究がある。具体的には、環状ポリアミン⁴⁶⁾や環状キノリン誘導体^{47,48)}による Cu²⁺イオンの輸送、イオノフォアを用いた Na⁺イオンの輸送⁴⁹⁾、3級アミンによるウランの輸送^{50,51)}などがあげられる。

一方、有機化合物を対象とした選択的輸送例は、脂溶性ジアミンを用いたアデノシン-2-リン酸やアデノシン-3-リン酸¹⁹⁾、脂溶性ホウ酸化合物を用いたヌクレオシドの輸送くらいで非常に少ない¹⁷⁾。

そこで、これまであまり研究されていない有機化合物を対象として、その分離輸送について検討した。前章で述べたように塩基性アミノ酸と中性アミノ酸では、pH 3~5 において、その正味電荷がそれぞれ異なっており、これを利用して分離輸送が可能であると推定した。同様に、塩基性アミノ酸の脱炭酸物質はアミン体で、正味電荷はゼロか正で、負にはならない。従って、条件によってはもとのアミノ酸と分離輸送が可能となると考えられ、いくつかの塩基性アミノ酸の脱炭酸化合物を用い、これらが元のアミノ酸と分離輸送できるような液体膜システムについて検討した。キャリアーは AOT (Fig. 1-1)、有機相はクロロホルムを用いた。

第1節 BAA とその脱炭酸化合物の液体膜輸送

第1章で詳述したが、塩基性アミノ酸は pH 5 でアニオン性キャリアー (AOT) を含む液体膜に移行し、pH 10 の水溶液へ輸送される。

一方、これら脱炭酸化合物は正の電荷が1個多くなるため、もとのアミノ酸とは、輸送挙動も異なると考えられる。アルギニン、オルニチン、そしてヒスチジン (His) からそれぞれ脱炭酸された形のアグマチン ($\text{NH}_2\text{-C(=NH)-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$)、プトレシン ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$)、そしてヒスタミン(Hm) を用い、膜輸送の挙動について調べた。相1および相2の pH をそれぞれ 5 と 10 とし、AOT を含むクロロホルムを液体膜 (有機相) とした。5時間後これら3種の化合物は 100% 有機相へ移行した。一方、有機相を介する相1から相2への輸送は Hm では認められたが、他の2種の化合物では相2への輸送はなかった⁵²⁾。これより、アグマチンやプトレシンは AOT と強く結合しており、Hm は結合力が比較的弱いことが分かった。第1章で示したように、相1の pH を 7 とすると His は AOT を含む有機相へ移行しない。このように、相1や相2の pH あるいはキャリアの濃度を適当に調節すれば His-Hm 混合物から His のみの輸送が可能になると考え、基礎的な検討を行った。

第2節 水相中の pH 変化と Hm および His の正味電荷

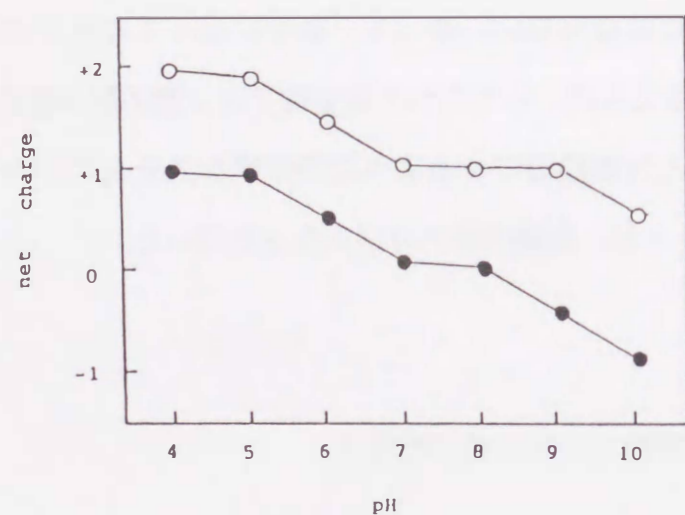


Fig. 2-1. Net charges of histamine (Hm) and histidine (His) at various pH conditions. The pKa values of imidazole and amino groups of Hm are 6.13 and 9.88, respectively.

○ Hm, ● His

イオン性化合物の分離には、正味電荷の相違を利用することが多い。そこで、実験で用いた pH における His と Hm の正味電荷を Fig.2-1 に示す。

ここで His の酸解離定数 (pKa) は Table 1-1 に示した値を、また Hm のそれは文献値 (pKa (Im) = 6.13, pKa (NH₂) = 9.88)⁵³⁾ を用いた。His においては pH 4~5 ではカルボキシル基はプロトンを解離し負になり、そしてアミノ基 (NH₂) とイミダゾール基 (Im) は両方とも正となっているため His の正味電荷は +1、pH 6 では Im が約 50% プロトン解離を起こし、His のそれはほぼ +0.5 となる。pH 7 になると Im のプロトン解離が進み、His の正味電荷はほぼゼロとなる。一方、Hm において pH 4、5 では正味電荷は +2、pH 6 と 7 では His と同様それぞれほぼ +1.5 とほぼ +1.0 となる。pH 9 では、His の正味電荷はほぼ -0.5、Hm のそれはほぼ +1 となり、pH 10 では His はほぼ -1.0、Hm はほぼ +0.5 となる。このように pH によって正味電荷が異なる領域があり、この部分を有効に利用すれば分離輸送が可能になると考えた。

第3節 AOT の濃度に依存した Hm の輸送挙動

His 輸送の AOT 濃度依存性については第1章で示した。Hm についても同様に調べた結果を Fig.2-2 に示す。図の横軸は反応時間で、左側は RR 値、右側は TR 値を示す。相1 および相2 の pH をそれぞれ 5.0 と 10.0 とし、Hm の初期濃度濃度は 1 mM とした。Hm はキャリアなしでは輸送されなかった。AOT 濃度を 0.4 mM にすると Hm は液体膜である有機相へ移行し、反応 5 時間後の RR 値は約 50% となった。また、AOT 1 mM の条件では、Hm は 5 時間後ほぼ 100% 有機相へ移行した。AOT 濃度がこれ以上になると Hm の有機相への移行速度が速くなり、5 mM では 3 時間、また 10 mM では 2 時間後に有機相へ移行した。

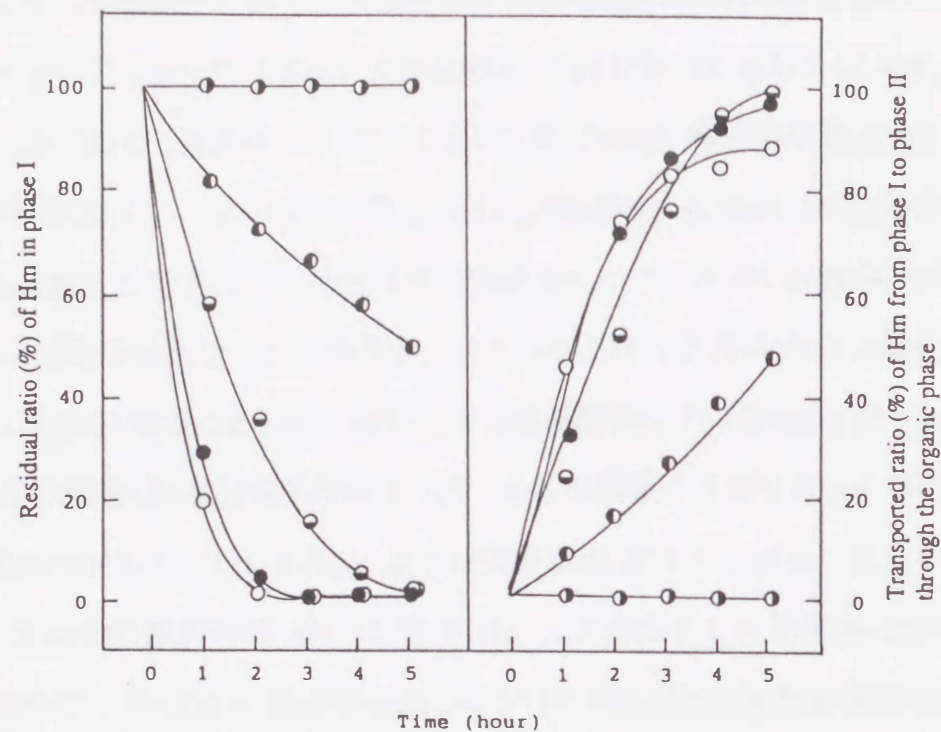


Fig. 2-2. The effect of AOT on the transport of Hm. The initial concentration of Hm in phase I was 1 mM. The pH values of phases I and II were 5.0 and 10, respectively. Both residual and transported ratios of Hm were plotted against the reaction time.
 ● 0 mM, ● 0.4 mM, ● 1 mM, ● 5 mM, ○ 10 mM

一方、有機相を介しての相1から相2への輸送は、AOT 5 mM までは有機相への移行量に依存し増大した。しかし、10 mM になると逆に TR 値の低下が見られた。これはキャリアー濃度が一定以上高くなると有機相への逆移行がおり Hm の輸送を妨げているものと考えられる。このように Hm は His に比べ非常に有機相へ移行しやすく、かつすみやかに相2への移行することが分かった。

第4節 His および Hm の液体膜輸送における pH 依存性

Hm と His を単独で用い、相1の pH 変化に対する輸送の影響を調べた。

AOT 濃度を 5 mM、相2の pH を 10.0 とした。Hm およ His の輸送挙動をそれぞれ Fig. 2-3 および Fig. 2-4 に示す。

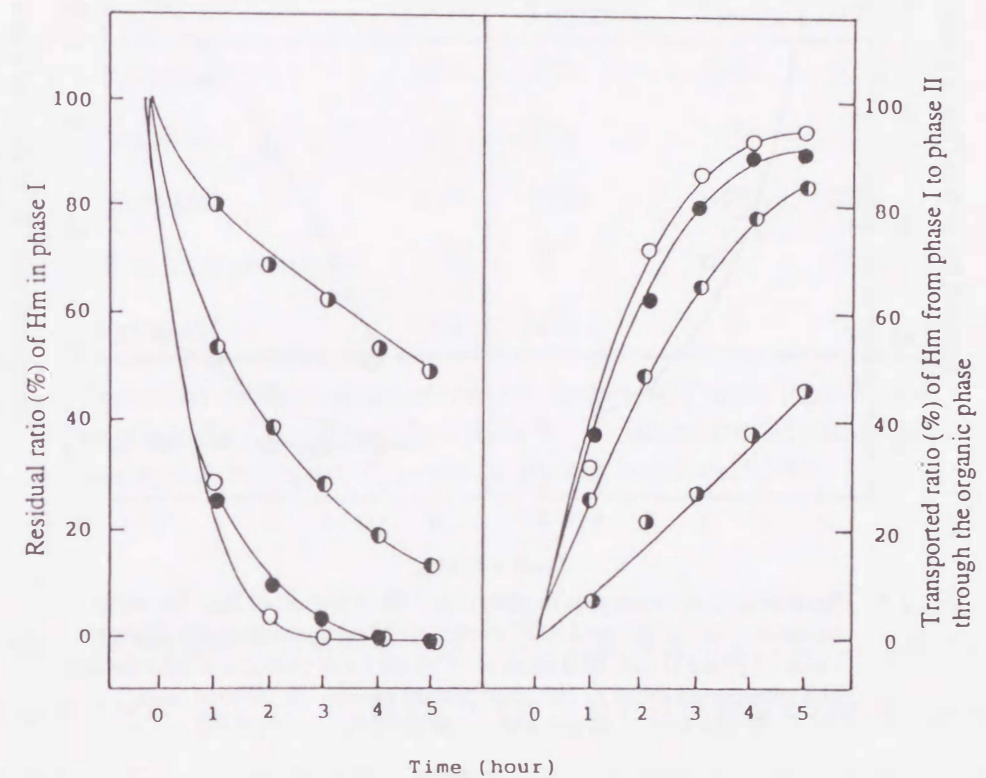


Fig. 2-3. Relationship between pHs in phase I and the transport of Hm. The initial concentrations of Hm and AOT were 1 and 5 mM, respectively. The pH value of phase II was 10.0 and that of phase I was changed. Both residual and transported ratios of Hm were plotted against the reaction time.
 ○ pH 5.0, ● pH 7.2, ● pH 8.0, ● pH 9.0

Hm では pH 5.0、7.2 において 5 時間後その 100% が有機相へ移行したが、pH 8.0、9.0 になると有機相への移行量が減少した。また Hm の有機相を介して相1から相2への輸送量は、相1から有機相への移行量に依存した。

一方 His では pH 4.0、5.0 において相1から有機相へ移行できるが、pH 6.0、7.2 になると有機相へ移行できない。また、His の有機相を介して相1から相2への輸送量は Hm 同様に相1から有機相への移行量に依存して多くなった。

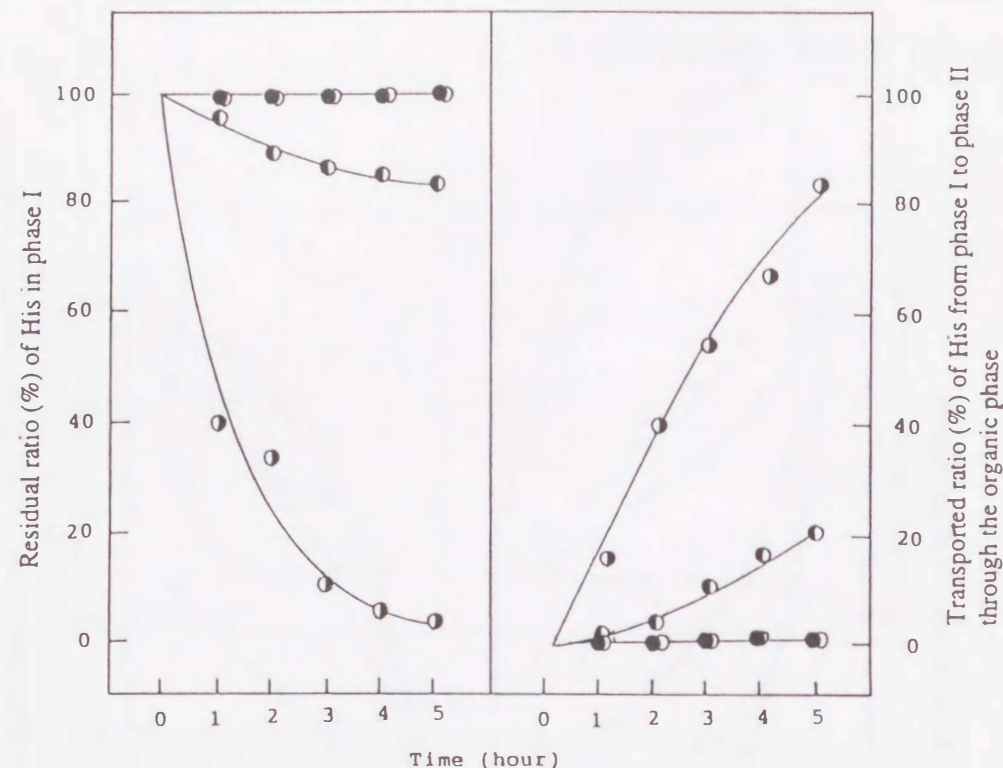


Fig. 2-4. Relationship between pHs in phase I and the transport of His. The initial concentrations of His and AOT were 1 and 5 mM, respectively. The pH value of phase II was 10.0 and that of phase I was changed. Both residual and transported ratios of Hm were plotted against the reaction time.
 ● pH 4.0, ○ pH 5.0, ● pH 6.0, ○ pH 7.2

さらにこのような正味電荷の相違による輸送挙動を、他のヒスチジン誘導体を用いて検討した。相1の pH を 5.0 と 7.2 にしたときの TR 値を Table 2-1 に示す。

pH 5.0 で His とほぼ同じ正味電荷を有するカルノシン (β -アラニルヒスチジン)そして Hm とほぼ同じ正味電荷を有するヒスチジノールの 5 時間後の TR 値はそれぞれ 19% と 95% で His (TR 値=20%), Hm (TR 値=95%) と同様の値を示した。

また、pH 7.2 では His とカルノシンは輸送されなかった。この pH では Hm やヒスチジノールは輸送され、これらの TR 値はそれぞれ 90%、98%であった。一方、ヒスチジノールリン酸では両方の pH でも輸送されなかった。

Table 2-1 Transported ratios of histamine and its related compounds after 2 and 5 hours.

Compounds	pH 5 in phase I		pH 7 in phase I	
	2 hours	5 hours	2 hours	5 hours
Histamine	72%	95%	63%	90%
Histidine	4%	20%	0	0
Histidinol	63%	95%	64%	98%
Histidinol phosphate	0	0	0	0
Carnosine	10%	19%	0	0

The initial concentrations of the sample and AOT were 1 and 5 mM, respectively. The pH value of phase II was 10 and that of phase I was changed as indicated. Reproducibility was less than $\pm 15\%$.

このことは、この物質は負の電荷を 2 個持つリン酸基を有しており、pH 5.0 でその正味電荷はほぼゼロ、pH 7.2 ではほぼ -1.0 となり正の電荷を持たないためと思われる。このように、正味電荷の違いが輸送挙動に影響を与えていることを明らかにすることが出来た。

次に相2の pH を変化させ、Hm の有機相を介して相1から相2への輸送挙動を調べた。結果を Fig.2-5 に示す。相1の pH を 5.0、AOT の濃度を 5 mMとした。測定したすべての pH において、Hm は 5 時間後 相1から有機相へ 100% 移行している。一方、有機相を介して相1から相2への移行は pH 7.2 では見られない。しかし pH 8.0、9.0 と高くなるにつれて、相2への輸送が増大した。また pH 9.0 と 10.0 とでは、相2への輸送量に変化がなかった。これは、高 pH 領域では Hm の正電荷が減少し、その結果 AOT との結合力が弱くなるため有機相から相2への移行量が増大したものと考えられる。

以上の結果より、相1の pH を 7.2、相2の pH を 10.0 そして AOT の濃度を 5 mM とすれば、His-Hm 混液から Hm の液体膜を用いた分離が可能であることが分かった。

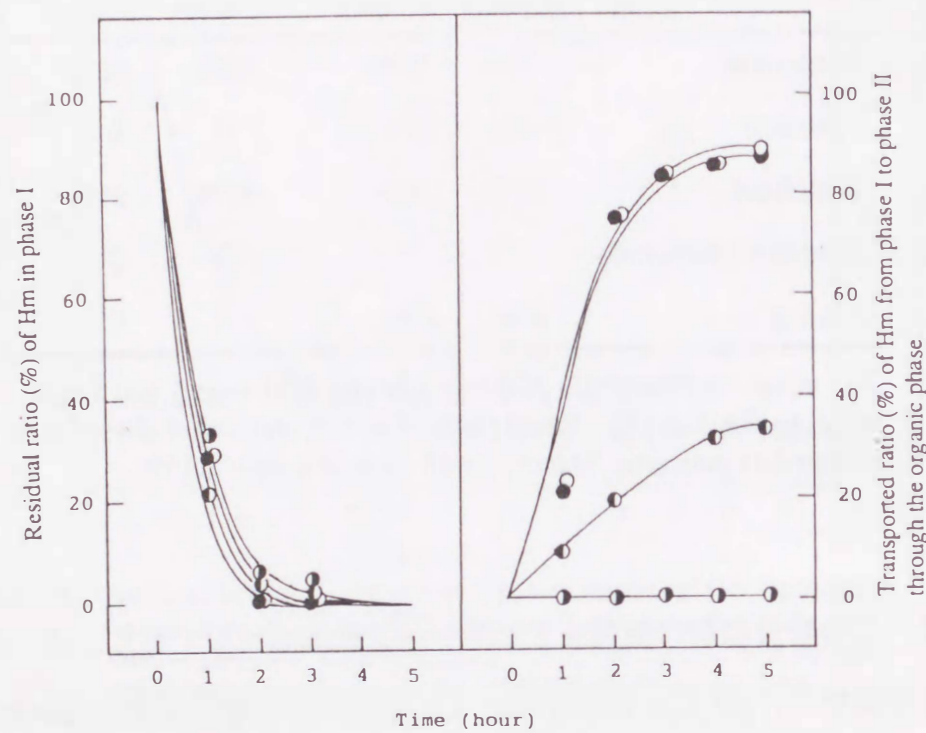


Fig. 2-5. The pH dependent transport of Hm. The initial concentrations of Hm and AOT were 1 and 5 mM, respectively. The pH value of phase I was 5.0 and that of phase II was changed. Both residual and transported ratios of Hm were plotted against the reaction time.
 ● pH 7.2, ● pH 8.0, ● pH 9.0, ○ pH 10.0

第5節 His-Hm 混液から Hm の選択的分離輸送

上記のように pH、キャリアー濃度を適当に選ぶことにより選択的分離輸送が可能であることが確認されたので、相1において His および Hm をそれぞれ初期濃度 1 mM ずつ加えた混合液の pH を 7.2 とし、相2の pH を 10.0、AOT の濃度を 5 mM とし実験を行った。

輸送挙動は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い追跡した。HPLC の分離液に 0.05 M リン酸-5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液 (15%メタノール含) を用いた。充填剤は Nucleosil 5 C₁₈ (5 μm) を、そして 220 nm を検出波長とした。

Fig. 2-6 は上記の条件で行った、輸送挙動のクロマトグラムである。相1では、3 および 5 時間では Hm のピークが減少している。相2ではこれらの時間でピークが増大しているが、His のピークは 5 時間後でも観測されなかった。

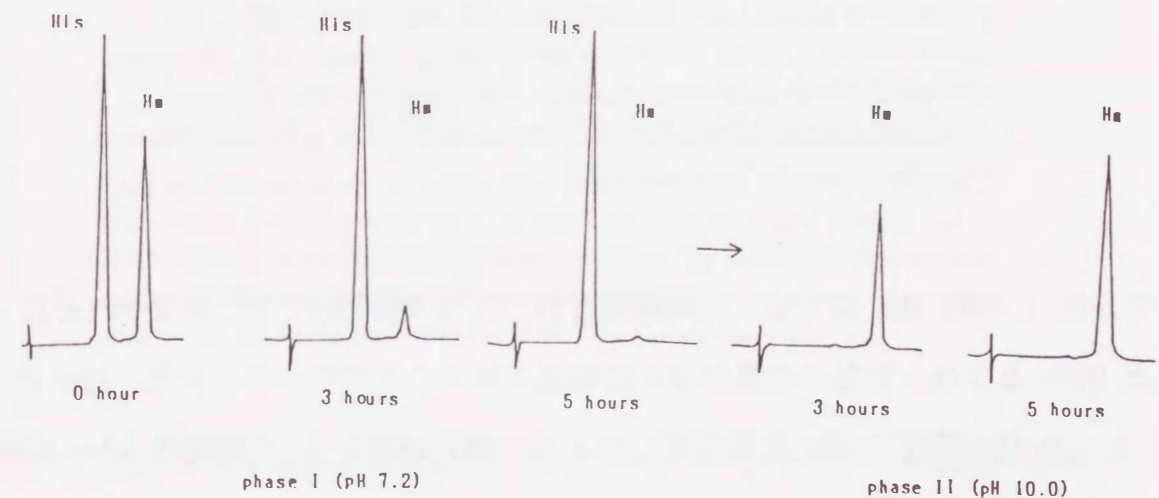


Fig. 2-6. The chromatogram of His and Hm in phases I and II. The initial concentrations of Hm and His in phase I were 1 mM. The concentration of AOT was 5mM. The pH values of phases I and II were 7.2 and 10.0, respectively. Separation was performed by eluting 0.05 M phosphoric acid and 5 mM sodium hexanesulfonate containing 15%(v/v) methanol. An analytical column (15 X 0.4 cm) containing Nucleosil 5C₁₈ (5 μm) was used.

さらにモル比を変えて His-Hm 混液で実験を行った。その結果を Table 2-2 に示す。

Table 2-2 Selective transport of histamine from the mixture of histidine and histamine at several molar ratios in phase I.

Initial molar ratio in phase I (His/Hm)		Transported ratio of Hm	
		2 hours	5 hours
1	Hm	60%	91%
	His	0	0
50	Hm	55%	83%
	His	0	0
100	Hm	65%	90%
	His	0.2%	0.4%

The initial concentrations of Hm and AOT were 1 and 5 mM, respectively. pH values of phases I and II were 7.2 and 10.0, respectively. HPLC was used for analysis. Separations were performed by eluting 0.05 M phosphoric acid and 5 mM sodium hexanesulfonate containing 15% (v/v) methanol. Analytical column (15 X 0.4 cm) containing Nucleosil 5C₁₈ (5 μm) was used. Reproducibility was less than ±15%.

モル比 1 の時 Hm は完全に分離輸送され、2、5 時間後の TR 値はそれぞれ 60% と 91% となり、かなりの量が相 2 に輸送されることが判った。また、Hm に対し 50、100 倍の濃度の His を加えても Hm の分離に影響なく、5 時間後 80~90% の TR 値を得た。しかし、このような大量の His を用いると、その一部が相 2 へ輸送してしまうことが分かった。

以上、互いに正味電荷の異なった物質を液体膜システムにより選択的に分離できることが判った。この原理を利用すると他のアミノ酸とその脱炭酸化合物も選択的分離が可能と思われる。たとえば、5-ヒドロキシトリプトファンとセロトニン、チロジンとチラミンなどは His と Hm と同様の液体膜輸送挙動を示すことが、著者の予備実験的により分かっている⁵⁴⁾。また第 1 節でとりあげたアグマチンやプトレシンなどは、液体膜から相 2 へは容易に移行しないが、相 2 にアンチポートカチオンを添加すると輸送可能であろう。

アミノ酸とその脱炭酸化合物を用い分離輸送について検討したが、逆にアミノ酸とその脱アミノ化合物でも同様に分離輸送が可能であり、His とこの脱アミノ体であるウロカニン酸 (Uro) がカチオン性キャリアーを含む液体膜により分離できた (Table 2-3)。

Table 2-3 Selective transport of Uro from the mixture of His and Uro at several pH conditions in phase I

pH	Compound	RR(%)		TR(%)	
		4 hours	8 hours	4 hours	8 hours
7	Uro	17.7±0.2	3.7±0.1	71.9±5.8	94.9±1.8
	His	100	100	0	0
9	Uro	16.2±0.7	5.3±0.1	3.8±7.6	92.1±6.1
	His	91.7±13	90.4±11	2.7±0.1	5.4±2.2

The initial concentrations of histidine (His) and urocanic acid (Uro) were 1, 1 mM, respectively. The concentration of MTO was 0.5 M. The pH value of phase II was 1.0. HPLC was used for analysis. Separation was performed by eluting 0.07M phosphoric acid and 5 mM sodium hexanesulfonate containing 10% (v/v) methanol. Analytical column (15 X 0.4 cm) containing Nucleosil 5 C₁₈ (5 μm) was used.

さらに、バルク液体膜を 2 個連結した装置 (Fig. 2-7) を用い、2 種類の溶媒とキャリアーを使って His、Hm、Uro の混合液から、Hm、Uro を別々に分離輸送できるシステムの試作を行った。

相 2 に His、Hm、Uro 混合物の pH 7.2 溶液、相 1 及び相 3 の pH をそれぞれ 1、10 とし、有機相 1 を塩化メチルトリオクチルアンモニウムのジクロロメタン溶液、有機相 2 を AOT のクロロホルム溶液とし輸送実験を行うと Uro は相 1 に、Hm は相 3 に選択的に輸送されることを著者らは確認している⁵⁵⁾。

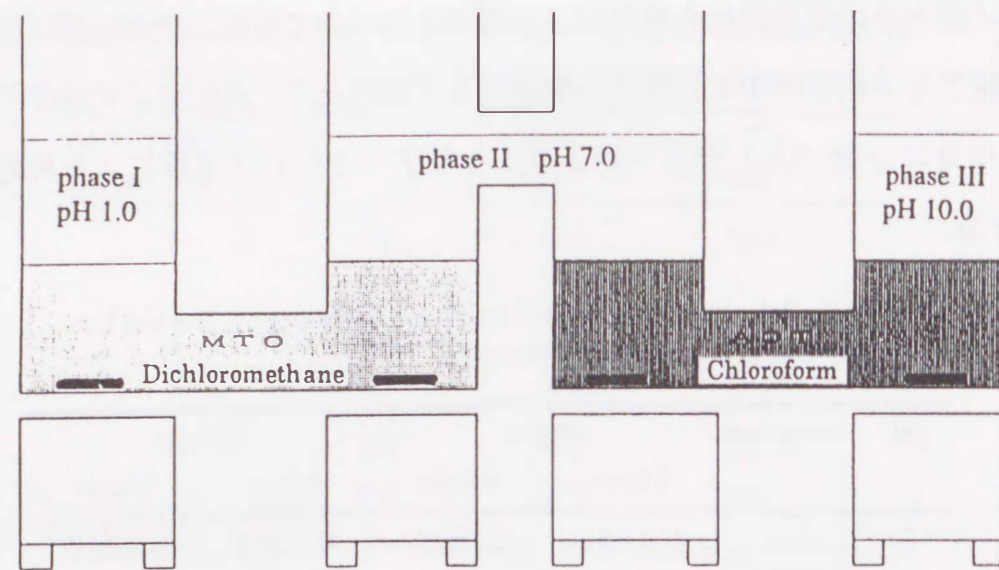


Fig. 2-7. Schematic diagram of a more complicated separation system

最近、AOT を含む液体膜を用いた、蛋白質や酵素（チトクロームC、リゾチーム、牛血清アルブミン）などの高分子の選択的分離も報告されており、これも pH 変化による蛋白質の正味電荷の違いを利用している²⁴⁾。

本液体膜システムを用いた分離は簡単な操作で行うことができ便利であるが、長時間を必要とし、少量しか分離できないこと、イオン性の物質しか輸送できないことなどの欠点があり今後の改良が必要と思われる。

結論

ある化合物を選択的に分離することは、分析化学では非常に重要である。被輸送物質がイオン性のとき、選択的輸送は、pH を変えることによる正味電荷の変化をもとにして可能である。

例として、塩基性アミノ酸である His とその脱炭酸体である Hm の混合液から、Hm が選択的に輸送できるシステムの検討を行った。

pH 5 では、Hm 及び His の正味電荷はそれぞれ +2、+1 となり、両方ともアニオン性キャリアーにより輸送可能であった pH を 7.2 にすると Hm の正味電荷は +1 であるが、His のそれはゼロとなり Hm のみの輸送が可能であった。このことから、His と Hm の混合液の pH を 7.2 にすることにより、Hm の選択的輸送が可能となった。この選択性は、His が Hm の 50~100 倍の濃度で存在しても、Hm の輸送に影響されなかった。

本研究は、His-Hm 系を用い、有効な分離が簡単な系で可能であることを示した。今後、他のアミノ酸とその脱炭酸体においても同様な選択的輸送が可能と推論される。

第3章 液体膜システムを利用したヒスタミンの合成と分離

これまで述べてきたように、液体膜システムではお互いに異なった正味電荷を有する物質の分離は可能である。しかし、同じ正味電荷を有するものでは、それらの疎水性、キャリアーとの親和性の相違により分離輸送可能な場合もあるが、一般的には困難である。このような場合、化学的な方法において、お互いに正味電荷の違った形に変換したり、また、輸送困難な物質でも、化学的な方法で輸送可能な形にすることにより、目的を達することが考えられる。

化学的な方法として、酵素がよく用いられている。これは酵素反応は基質特異性が高く、かつ穏やかな反応条件で起こるからである。酵素の特異性を利用した有機合成はよく行われている⁵⁶⁾。酵素反応を利用した液体膜輸送例として、Rethwischらは脂溶性の低い有機酸をリパーゼにより脂溶性の高いエステル体にしその輸送量が増加することを示した⁵⁷⁾。

第2章において、His と Hm がお互いに分離できることを示したが、この章では、His から酵素 (L-ヒスチジンデカルボキシラーゼ、HD) 反応により Hm を合成し、生成された Hm のみを選択的に輸送する実験を計画した。

第1節 HD 非存在下での相2のpHに依存したHmの液体膜輸送

HDの至適pHが4.5⁵⁸⁾であり、このpHでは、第2章に示したようにキャリアーにAOTを用いる実験では、Hisも輸送されてしまう。そこで、いくつかのキャリアーを用いて実験した結果、脂溶性リン酸化合物であるジ-2-エチルヘキシルリン酸 (EHP, Fig.3-1) が適当であることが分かったので、EHPを用いることにした。

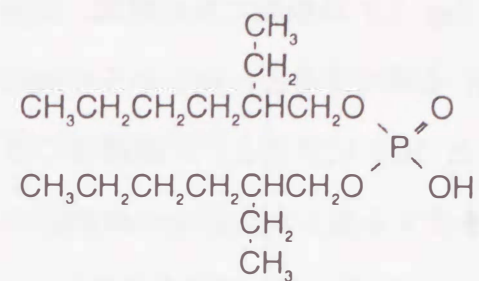


Fig. 3-1. The structure of di-(2-ethylhexyl) phosphoric acid (EHP)

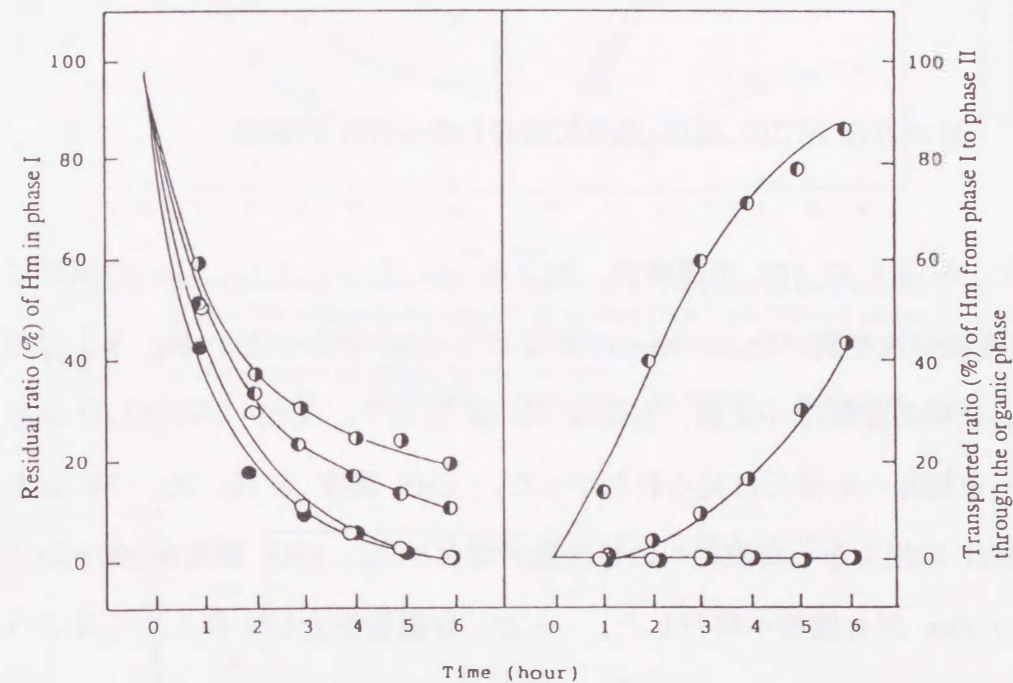


Fig. 3-2. Relationship between pHs in phase II and the transport of Hm. The initial concentrations of Hm in phase I and EHP in chloroform phase were 1 and 50 mM, respectively. The pH values of phase I was 4.5 and that of phase II was changed as indicated. Residual and transported ratios of Hm were plotted against the reaction time.
 ● pH 7.2, ○ pH 8.0, ○ pH 9.0, ● pH 10.0

相1では、HDを用いるので、pHは4.5と固定し、相2のpHを変化させ、Hmの輸送挙動について検討した。

EHPの濃度は50 mMとした。Hmの相1での初期濃度は1 mMで、有機溶媒

はクロロホルムであった。Fig. 3-2 は横軸に反応時間、縦軸の左側に RR 値、右側に TR 値を示す。相 2 の pH を高くすると、相 1 から有機相へ Hm の移行が増大した。また相 1 の pH を 9.0 と 10.0 にすると、6 時間後には Hm は 100% 有機相へ移行した。しかし、有機相を介する相 1 から相 2 への輸送は、相 2 の pH 9.0、および 10.0 では見られず pH 7.2 の時最も高い輸送量を示した。AOT を用いた場合は逆の結果が得られたが詳細は不明である。これら結果から、相 2 の pH を 7.2 とした。次に、Hm の輸送挙動に対する EHP の濃度の影響を調べた。

第 2 節 HD 非存在下での EHP 濃度に依存した Hm の輸送

相 1 に pH 4.5 の HD 用緩衝液、相 2 の pH を 7.2 とし、Hm の輸送における EHP 濃度依存性を調べた。Hm の濃度は 1 mM であった。Fig. 3-3 は反応時間に対し、縦軸の左側は RR 値、右側は TR 値を示す。EHP が存在しないと Hm の相 1 から有機相への移行は見られなかった。EHP 濃度を 10、30、50 mM と高くすると Hm の相 1 から有機相への移行量が増大した。EHP 濃度を 100 mM とすると 100% の Hm が有機相へ移行した。一方、有機相を介して相 1 から相 2 への輸送をみると EHP が 50 mM までは、有機相への移行量に依存して増大したが、EHP が 100 mM となると逆に減少した。同様の現象がキャリアーとして AOT を用いた時にも見られた。

さらに EHP 濃度を変化させた輸送結果を Fig. 3-4 に示す。図で縦軸は TR 値を横軸は EHP の濃度を示す。TR 値は 3 時間および 6 時間反応後の値をプロットした。

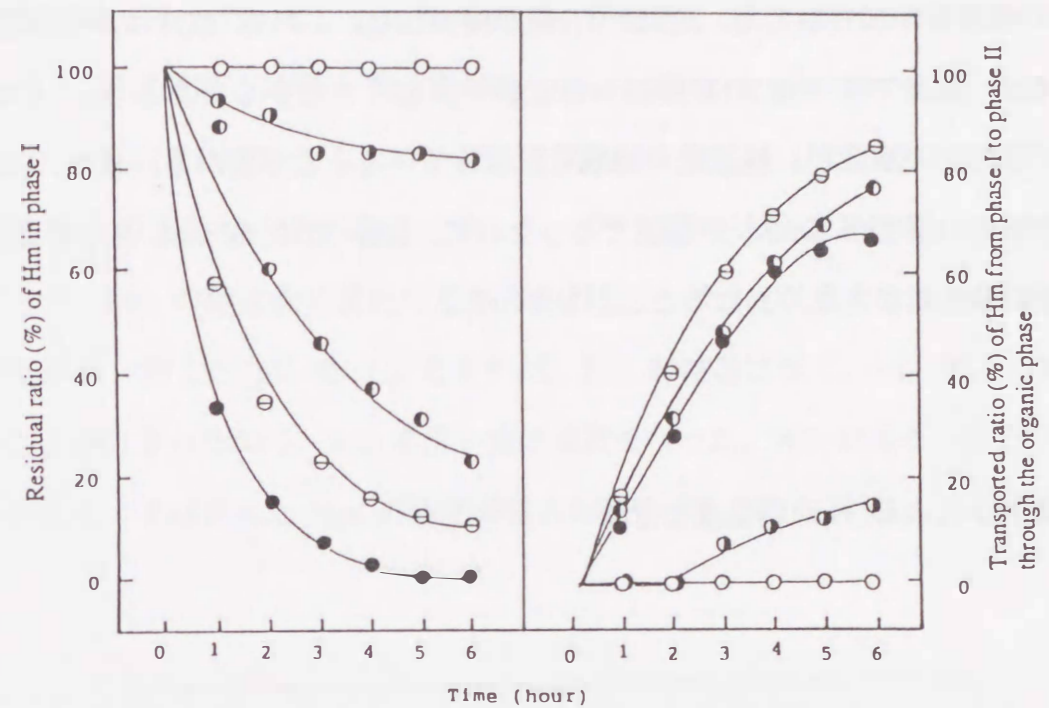


Fig. 3-3 The relationship between the concentration of EHP and Hm on the transport of Hm. The initial concentration of Hm in phase I was 1 mM. The pH values of phases I and II were 4.5 and 7.2, respectively. Residual and transported ratios of Hm were plotted against the reaction time.
○ 0 mM, ● 10 mM, ● 30 mM, ⊖ 50 mM, ● 100 mM

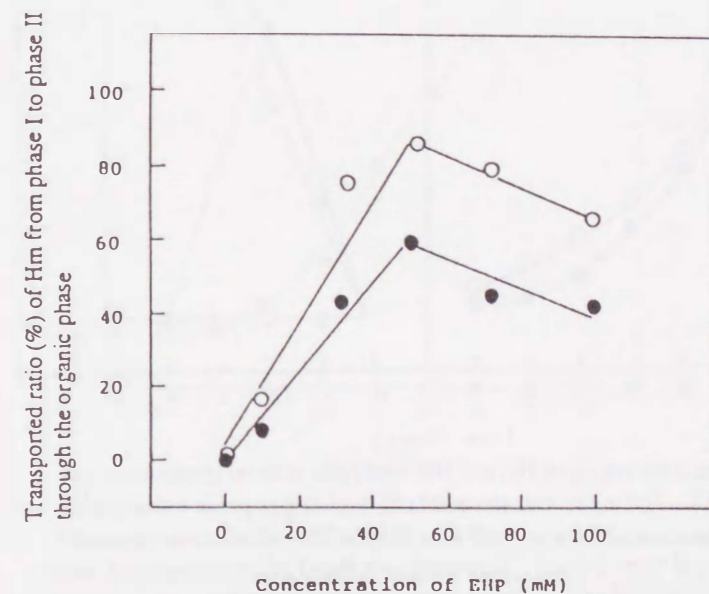


Fig. 3-4. Plots of transported ratio of Hm as a function of the concentration of EHP. The initial concentration of Hm in phase I was 1 mM. The pH values of phases I and II were 4.5 and 7.2, respectively. The transported ratio was plotted against the concentration of EHP after 3 and 6 hours.
● 3 hours, ○ 6 hours

EHP 濃度が高くなるにつれて、TR 値が高くなり、50 mM で最高になった。以後 EHP の濃度を増加させても、逆に、TR 値が減少した。これも AOT の時と同様に、高い EHP 濃度では Hm の有機相への逆移行が起こったからであろう。このようにキャリアーの濃度が、輸送量の増減に影響していることが分かる。また、AOT を用いた時その濃度が 5 mM が最適であったのに、EHP では 50 mM とキャリアーによりその輸送能が大きく異なることが分かった。

第3節 HD による Hm の生成と分離

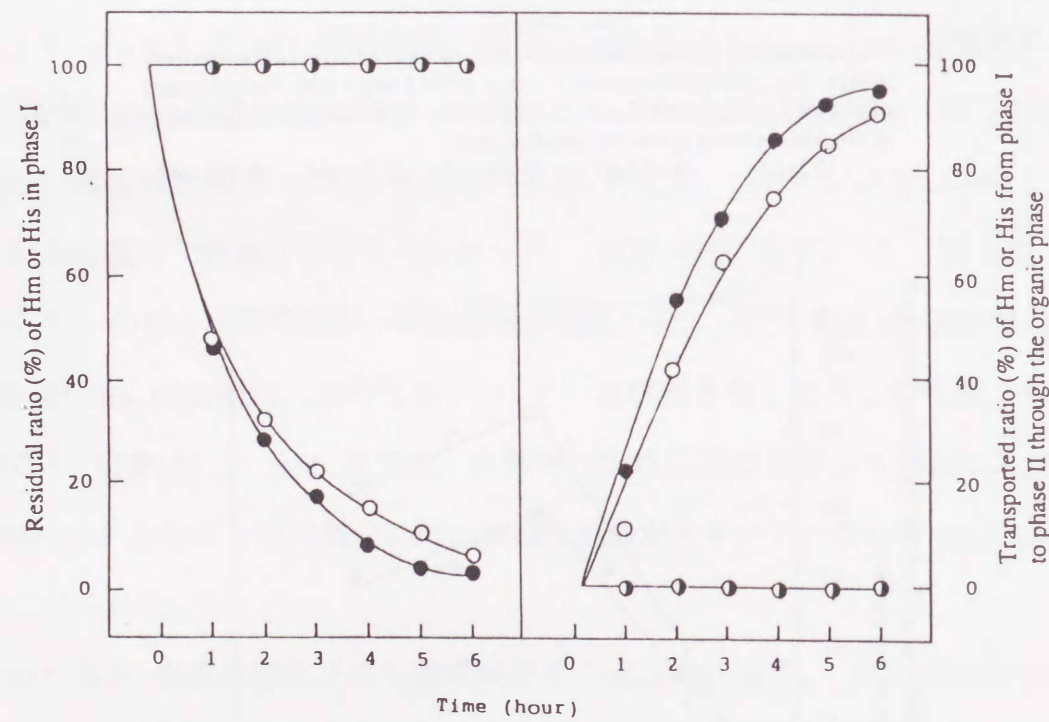


Fig. 3-5. The time course of His and Hm transports at room temperature and 35°C. The initial concentration of His or Hm in phase I was 1 mM. The concentration of EHP was 50 mM. The pH values of phases I and II were 4.5 and 7.2, respectively. Residual and transported ratios of Hm or His were plotted against the reaction time.

○ Hm at room temperature, ● Hm at 35°C,
◐ His at 35°C

第1、2節で行った基礎的な実験結果から相2の pH が 7.2、EHP の濃度が 50 mM が適当と分かったので、この条件で His が輸送されないかどうかを調べた。

Fig. 3-5 に反応時間に対する His と Hm の RR 値と TR 値をプロットした。この時、HD の反応を促進させるために測定系の温度を 35°C にした。この温度でも His の有機相への移行はみられなかった。一方、Hm は輸送された。また室温と 35°C とで、Hm の輸送量に変化は見いだされなかった。以上のような基礎的な実験結果から、相2の pH を 7.2 とすれば、His の輸送はなく、Hm のみが輸送されることが分かったので、HD を用い輸送実験を行った。HD による His から Hm への変化と、生成された Hm の輸送挙動の結果を Fig.3-6 に示す。

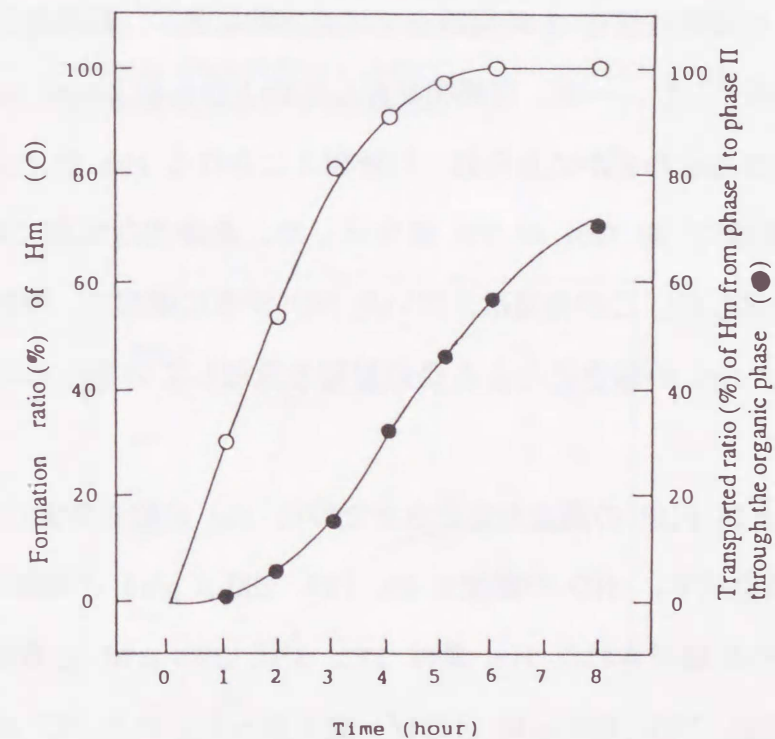


Fig. 3-6. Relationship between production of Hm and amounts of transported Hm in phase II. Initially, phase I contained 1 mM His, 40 μg/ml pyridoxal-5-phosphate, and 40 μg/ml HD at pH 4.5. The pH value of phase II was 7.2. The concentration of EHP was 50 mM. Formation ratio = (the concentration of Hm / the hypothetical concentration of Hm which is perfectly transformed from His) X 100. In this figure, the transported ratio was calculated by using the amount of Hm at 100% formation ratio as an initial concentration.

図中で縦軸の左側には Hm の生成率 (Formation ratio, FR(%)) を、そして右側には、Hm の輸送量 (TR%) を示す。Hm, His の定量は HPLC を用いた。分離条件は第 2 章で行った同じ条件であった。

ここで

$$FR = (\text{実際に生成した Hm 量}) / (\text{用いた His が HD によりすべて Hm に変換されたと仮定した量}) \times 100$$

またこの実験において

$$TR = (\text{実際に輸送された Hm 量}) / (\text{用いた His が HD によりすべて Hm に変換されたと仮定した量}) \times 100$$

とした。

His から Hm の変換は反応 3 時間後までは直線的に生じ、以後飽和曲線に従い、6 時間後反応は完了した。一方、有機相を介して相 1 から相 2 への Hm の移行は、FR 値が 80% になるとわずかに見られ、以後相 1 における Hm の生成量に依存して増加し、8 時間後で約 70% の TR 値を示した。基礎的な実験では、Hm は約 95% の TR 値を示した。この相違は、用いた HD が水に難溶で、懸濁した状態で使用しているため、Hm の輸送になんらかの影響を及ぼしているために起きたと考えられる。

次に、HD および EHP の濃度を変化させた時の Hm の輸送挙動について調べた。Table 3-1 に結果を示す。HD の濃度を 40、120、200 $\mu\text{g/ml}$ と増加させると、3 時間反応後に相 2 中に輸送された Hm 量は 170、370、390 μM と増加するが、反応 8 時間後では、700、760、670 μM とほぼ一定となった。また HD 200 $\mu\text{g/ml}$ において、EHP の濃度を変化させると、EHP 50 mM の時が最大の輸送量を示し、100 mM EHP では反対に減少した。

Table 3-1 Recovery of Hm in phase II at various concentrations of HD and EHP

HD ($\mu\text{g/ml}$)	EHP (mM)	Concentration of Hm (μM)	
		3 hours	8 hours
0	50	0	0
40	50	170 \pm 40	700 \pm 20
120	50	370 \pm 40	760 \pm 90
200	50	390 \pm 50	670 \pm 50
200	10	30 \pm 10	170 \pm 40
200	100	220 \pm 50	510 \pm 90

The initial concentrations of His in phase I was 1 mM. The concentration of pyridoxal phosphate was 40 $\mu\text{M/ml}$. The pH values of phases I and II were 4.5 and 7.2, respectively. HPLC was used for analysis. Separations were performed by eluting 5 mM sodium hexanesulfonate containing 15% (v/v) methanol. An analytical column (15 X 0.4 cm) containing Nucleosil 5C₁₈ (5 μm) was used.

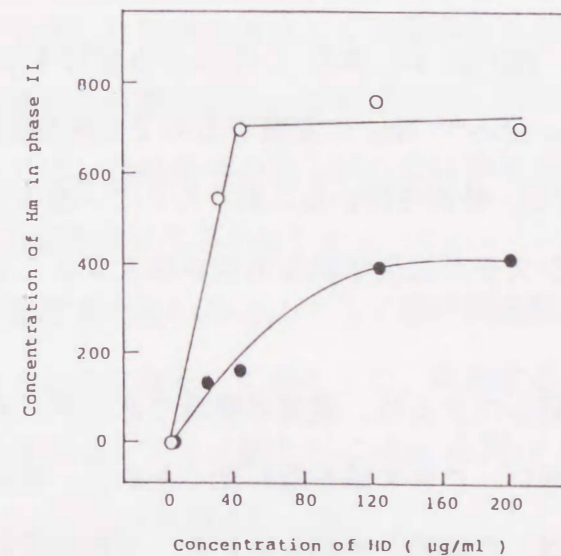


Fig. 3-7. Effect of HD concentration on the transport of Hm into phase II. The concentration of EHP was 50 mM. 40 $\mu\text{g/ml}$ pyridoxal-5-phosphate was added to phase I. The pH values of phases I and II were 4.5 and 7.2, respectively. The transported Hm was plotted against the concentration of HD.
● 3 hours, ○ 8 hours

従って、基礎的な実験結果と同様の結果が得られ、基礎的な実験結果が、実際の反応システムにも反映していることが分かった。

HD の濃度変化に対する Hm の輸送挙動を、Fig.3-7 に示す。EHP の濃度は 50 mM、相 1 中の His の初期濃度は 1 mM であった。図は HD の濃度と、相 2 へ輸送された Hm 量との関係を示す。3 時間後では、低濃度の HD では反応が不十分であり輸送量が少なかった。しかし 8 時間後の Hm 量をみると 40 μ g/ml までは HD 濃度依存的に増加した。この濃度以後では、輸送量がほぼ一定になった。この結果、このシステムでは HD 量は 40 μ g/ml が適当であることが分かった。

以上、アミノ酸のカルボキシル基を脱炭酸酵素により取り除き、生成した物質と原料のアミノ酸との正味電荷の違いを利用した、生体アミン (Hm) の合成と分離について述べた。この結果から、他のアミノ酸から生理活性の高い生体アミンの合成と分離も可能と考えられる。第 2 章で述べたように、セロトニン、チラミンも同様に分離輸送できることが初期的な実験ながら可能であることから、これらの合成と分離も行えるであろう。一方、酵素反応は非常に基質特異性が高く、アミノ酸の D-体と L-体をも認識することができる。このことを利用すると、DL-体の分割が可能であると考えられる^{59~61)}。HD は DL-体の L-体にのみ反応する。DL-混合体に HD を反応させれば、L-His のみが Hm に変換するのでこれを分離すると D-体が残る⁶²⁾。このような考え方で、酵素を用いると種々のアミノ酸の光学分割も可能であろう。このように液体膜システムに化学的な方法を導入することにより広範囲な応用が期待される。

今回用いた、バルク液体膜システムは、装置は簡単であるが、水相に比し有機相の体積が大きく輸送効率が悪い。この欠陥を取り除くために、乳化型液体膜システムが考案されている。これは、有機相と水相を乳化剤 (界面活性剤) を用い乳化させ (water-in-oil, W/O 型エマルジョン)、さらにこれを第 3 の水相中に懸濁分散させた water-in-oil-in-water (W/O/W) 型多相エマルジョンである。

すなわち、乳化剤を含む有機相が外水相と外水相に挟まれた形で液体膜を構成し、目的物質が外水相から内水相へ輸送される。これは装置の単位体積当たりの反応界面が非常に大きく、また膜も薄いので、大きな透過速度が得られる³⁾。しかし、液体膜の作成は行程が煩わしく、目的物を取りだすのに、逆の行程、つまり W/O/W 型エマルジョンから W/O 型エマルジョンを分離させ、これから水相と有機相とを分離させる必要がある。また液体膜の安定性に問題があり、より安定な界面活性剤の出現が待たれる⁶³⁾。乳化型液体膜システムでは、その内水相中で酵素活性は保たれていることが知られている^{64~66)}。このことを利用した物質の合成がさまざまな領域で行なわれている。例えば、 α -キモトリプシンを用いた疎水性ペプチドの合成がある。しかし、分離操作煩わしいことから、目的物質の分離のために中空糸を使用している⁶⁷⁾。

結論

有機合成では、生成した物質を純度よく分離することは重要なところで、この操作を簡単化するのは極めて有益である。この章では、液体膜システムを用いて試行した。このシステムでは、合成条件の激しいものは使用できない。そこで、穏やかな反応条件でよい、酵素を用いることにした。

アミノ酸の脱炭酸酵素を用いると、アミノ酸は脱炭酸化され、もとのアミノ酸とは正味電荷が異なるようになる。このことを、利用すると生成物の分離が可能となると予測した。本章では、アミノ酸として His を用い HD を反応させ、生成した Hm を輸送できるシステムの検討を行った。

HD の至適 pH は 4.5 であり、この pH では、AOT を用いた液体膜では、His を同時に輸送してしまうので、新しいキャリアーとして、EHP を選んだ。

相1に His と HD の pH 4.5 溶液、相2の pH を 7.2 にし反応させると、Hm が生成し、同時に、有機相を介して相2へ輸送された。輸送量は His がすべて Hm に変化したものとして、その約 70% であった。合成と分離の両方の機能を有する本システムは種々の反応系に利用できる可能性がある。

第4章 液体膜系におけるタウリン及び関連化合物の透過性

タウリンはアミノ基とスルホン基を持つアミノ酸の一種である。植物界における分布はきわめて限られているが、哺乳類には広く分布し心筋、骨格筋、中枢神経組織、網膜などの組織や胆汁、血漿、母乳などの体液にも多量存在している^{68,69}。タウリンの生理機能は、解毒作用、抗酸化作用、網膜正常化の維持⁷⁰、神経組織に対してはニューロトランスミッターあるいはモジュレーター⁷¹としての働き、などが考えられている。また、タウリンは細胞内浸透圧調節物質としての役割もある⁷²。

タウリンはその構造にスルホン基を持つが故に、そのアミノ基の酸解離定数 (pKa) が 9.02⁷³ と一般のアミノ酸 (たとえば構造類似体であるβ-アラニンのアミノ基の pKa が 10.2⁷⁴) より低く、塩基性が弱い。アミノ酸の持つ高い金属錯体形成能はそれらの生物学的活性を考える上で重要な特徴となる。しかしながらタウリンは遷移金属に対して一般のアミノ酸に比べ錯体安定度は低い^{75,76}。またタウリンは最終代謝産物でありそのままの形で排泄される⁷⁷ など一般アミノ酸とは非常に異なった性質を有する。

このような性質を有するタウリンの生体膜輸送は興味を持たれる。そこで、タウリンの膜輸送をモデル膜として液体膜を用いて研究を行った。生体系においては、タウリンの輸送は、キャリアーを介した輸送であり、Na⁺ や Cl⁻イオン依存的に輸送量が増大し^{78,79}、β-アラニンのようなβ-アミノ酸がその輸送を阻害することが知られている^{80,81}。一般アミノ酸との相違は、タウリンではカルボキシル基の代わりにスルホン基を有しているので、タウリン誘導体としてω-アミノアルカンスルホン酸 [NH₂-(CH₂)_n-SO₃H, n = 2, 4, 6, 8, 10, ω-AS]、そしてアミノ酸誘導体としてω-アミノカルボン酸 [NH₂-(CH₂)_n-COOH, n = 2, 4, 7, 10, ω-AA] を用い液体膜による輸送挙動を比較検討した。

ω -Aminoalkanesulfonic acid ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$)

n=2	2-Aminoethanesulfonic acid	C-2 (taurine)
n=4	4-Aminobutanesulfonic acid	C-4
n=6	6-Aminohexanesulfonic acid	C-6
n=8	8-Aminooctanesulfonic acid	C-8
n=10	10-Aminodecane sulfonic acid	C-10

ω -Aminocarboxylic acid ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$)

n=2	3-Aminopropionic acid	A-2 (β -alanine)
n=4	5-Aminopentanoic acid	A-4
n=7	8-Aminooctanoic acid	A-7
n=10	11-Aminoundecanoic acid	A-10

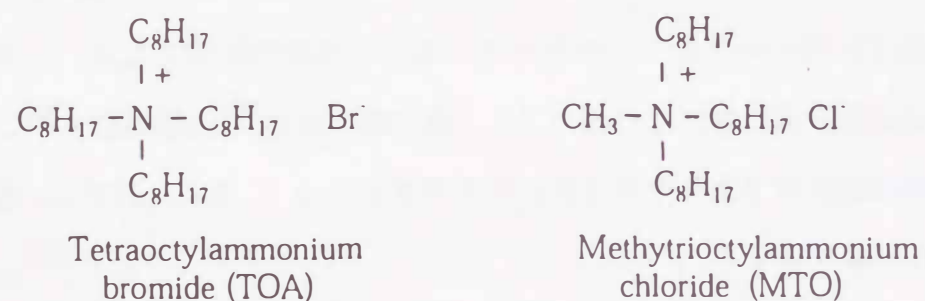


Fig. 4-1. Structures and abbreviations of ω -aminoalkanesulfonic acid (ω -AS), ω -aminocarboxylic acid (ω -AA) and two carriers (TOA and MTO).

有機溶媒はクロロホルム、キャリアーとして脂溶性カチオンである塩化メチルトリオクチルアンモニウム (MTO)、臭化テトラオクチルアンモニウム (TOA) を用いた。ここで使用したキャリアー、試料の構造およびこれらの略名を Fig. 4-1 に示した。

第1節 膜透過におけるいくつかの ω -AS および ω -AA の pH 依存性

タウリンは一般のアミノ酸と同じく、生理 pH 条件では、双性イオンとして存在しており、二個の親水基 ($-\text{NH}_3^+$ と $-\text{SO}_3^-$) を有しているため、有機相へは移動し難い。そこで、pH を高くするとそのアンモニウムイオン ($-\text{NH}_3^+$) がプロトン解離を起こし脂溶性の ($-\text{NH}_2$) となる。また全体としてアニオン体となるため、液体膜中のカチオン性キャリアーと結合し、有機相へ移行できると考えられる。

このことから相1の pH を変化させ有機相への移行の様子を調べた。Fig. 4-2 の横軸は pH を、縦軸は初期濃度に対する6時間後の残存量の比 (Residual Ratio, RR%) を示す。相2の pH は 5.0 で、キャリアー (MTO) および試料の初期濃度はそれぞれ 10 mM, 1 mM で行った。

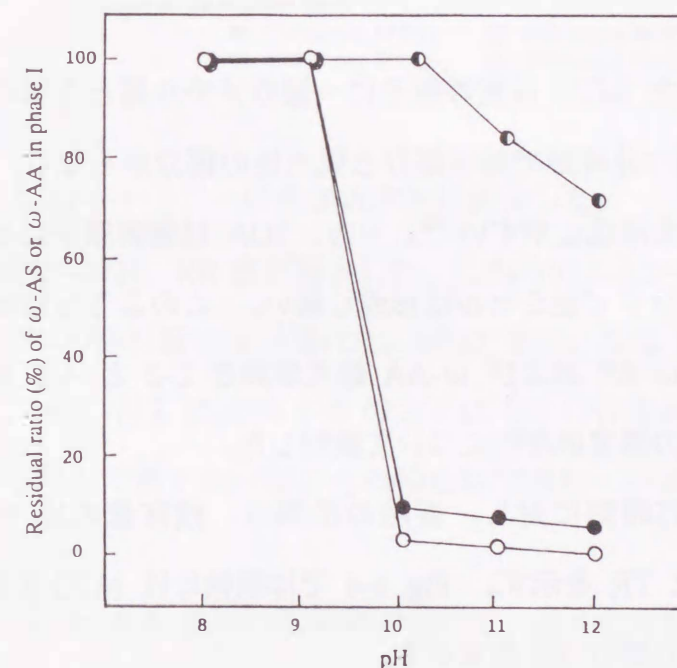


Fig. 4-2. Relationship between the pH in phase I and the residual ratios of several ω -AS and ω -AA. The initial concentration of the sample and MTO were 1 and 10 mM, respectively. The pH value of phase II was 5.0 and that of phase I was changed. Data were obtained after 6 hours of reaction. The residual ratio was plotted against the pH value of phase I.

● C-2, ○ C-6, ◐ A-2

pH 8.0, 9.0 では、使用した化合物は有機相へ移行せず、pH 10.0 では C-2 と C-6 が移行した。C-2 ではその pKa (NH₂) が 9.02 であり、この pH では十分に アニオン体になっている。C-6 ではその pKa (NH₂) が 10.91⁷⁹⁾ であり約 90% が -NH₃⁺ となっているが、高い疎水性の炭素鎖 (n = 6) を有するため、有機相への移行が可能になったものと考えられた。以後 pH が高くなっても両方とも移行量にはあまり変化がなく、pH 12.5 で C-2 が約 10%、C-6 では 0% の RR 値を示した。

一方、A-2 においても、その pKa (NH₂) が 10.2 であるため上記のように pH が 11.0 より高い条件で有機相へ移行した。しかしながら、C-2 に比べ A-2 の有機相への移行量は少なく、pH 12.5 で RR 値は約 75% となった。

第2節 ω-AS および ω-AA の輸送挙動に対するキャリアーの影響

キャリアーとして用いた MTO は窒素原子に一個のメチル基と 3 個のオクチル基が結合しており、構造的に非球形で疎水部分と親水性の部分からなり、このような構造の化合物は逆ミセルを形成しやすい⁸⁰⁾。一方、TOA は窒素原子に 4 個のオクチル基が結合しており球形分子で逆ミセルは形成し難い。このような性質を持った 2 種類のキャリアーによる ω-AS および ω-AA 輸送挙動を C-2 と A-2 を用い反応時間依存性及びキャリアーの濃度依存性について検討した。

Fig.4-3 では横軸は反応時間に対し、縦軸の左側は、残存量の比 RR (Residual ratio)、右側には輸送量比 TR を示す。Fig. 4-4 では横軸には MTO または TOA の濃度、縦軸には 6 時間反応後の RR 値を示す。

MTO を用いると C-2 では 2.5mM でおよそ 80% が有機相へ移行し、以後濃度を増加させても、その移行量はあまり変化がなかった。

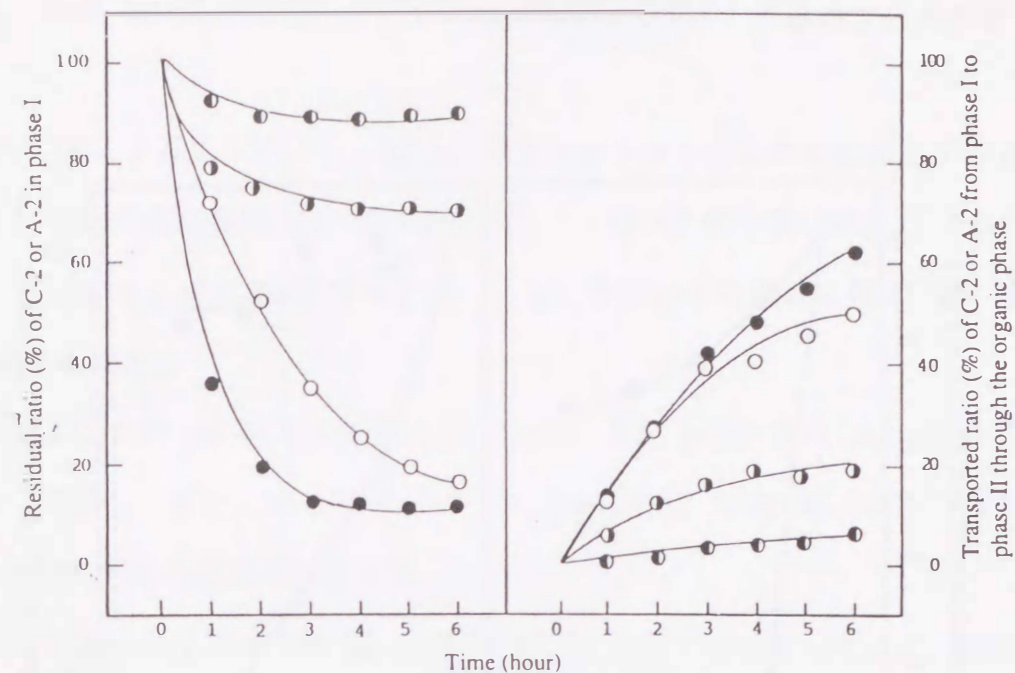


Fig. 4-3. The time-dependent decrease in the residual ratios of C-2 and A-2 where MTO or TOA was used as a carrier. The initial concentrations of the sample in phase I, MTO and TOA in the organic phase were 1, 10 and 10 mM, respectively. The pH values of phases I and II were 12.5 and 5.0, respectively. Residual and transported ratios were plotted against the reaction time.

● C-2 (using MTO), ○ C-2 (using TOA), ● A-2 (using MTO), ○ A-2 (using TOA)

また、A-2 ではキャリアーの濃度依存的に減少した。一方、TOA を用いると両方が TOA 濃度依存的に RR 値が減少した。これらのことから、MTO と TOA では明らかに有機相への移行量に差が現れた。MTO を用いたほうが、有機相への移行量が多くなった。また A-2 に比べ C-2 の方がはるかに有機相へ移行しやすかった。一方、有機相を介して相 1 から相 2 への輸送は有機相への移行量に依存して増加した。

この様に、C-2 と A-2 を用いた実験において、逆ミセルを形成しやすいキャリアーを用いると、C-2 や A-2 は有機相へ移行しやすくなることが示された。これは、相 1 の水と逆ミセル中の water pool とが平衡状態になっており、水相中の水と共に溶質も water pool に取り込まれやすくなるため、比較的親水性の化合物でも有機相へ

移行できるからである³⁾。

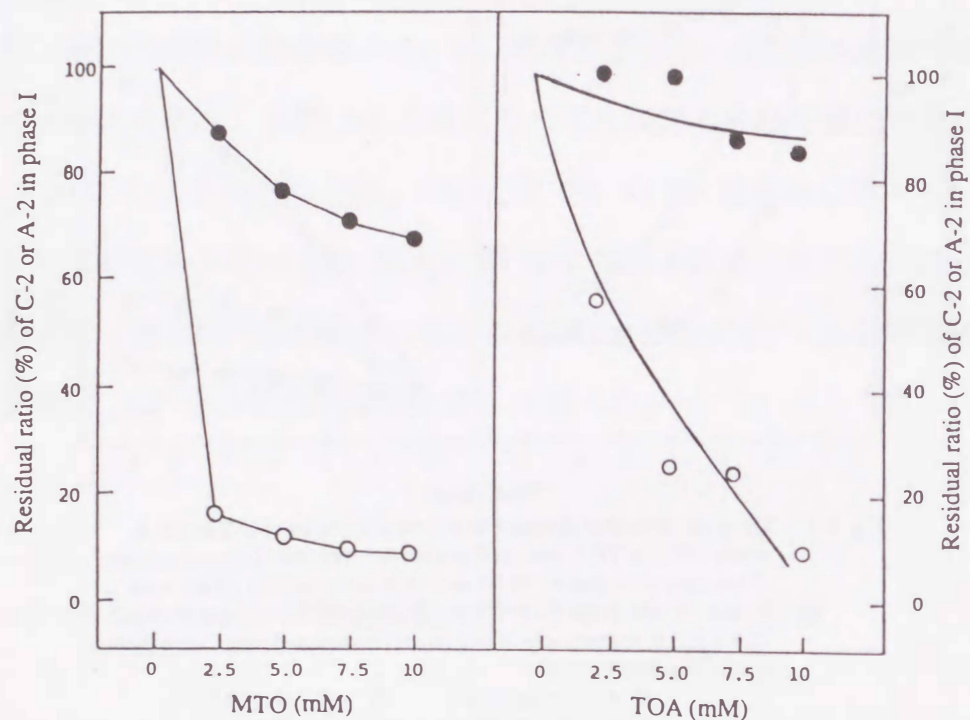


Fig. 4-4. The residual ratios of C-2 and A-2 in phase I where the carrier concentration of MTO or TOA was changed. The initial concentration of the sample in phase I was 1 mM. The pH values of phases I and II were 12.5 and 5.0, respectively. Data were obtained after 6 hours of reaction.
○ C-2, ● A-2

このような結果は Luisi らの次のような研究結果からも支持される⁸²⁾。彼らは、中性～弱アルカリの pH 条件 (pH 7~10) においてアミノ酸誘導体である L-トリプトファンや L-トリプトフィルグリシンが MTO を含むシクロヘキサン相へ移行することを示した。さらに α -キモトリプシンのような酵素でさえも有機相へ移行されることを示した。一方、TOA はイオン会合性試薬として知られており、被輸送物質と結合することにより脂溶性が増し、有機相への移行が可能となると考えられる^{83,84)}。

第3節 各種 ω -AS および ω -AA の液体膜輸送挙動

次に、アミノ基とスルホン基またはカルボキシル基の間に炭素原子を2個以上有する化合物の液体膜輸送について調べた。用いた化合物の略名は Fig.4-1 に示した。Table 4-1 には各種 ω -AS や ω -AA を用い6時間反応後の RR 値および TR 値をまとめた。

相1および2の pH はそれぞれ 12.5 と 5.0、また MTO あるいは TOA の濃度は 5 mM とした。またこれらのデータから Fig.4-5 に TOA を、また Fig.4-6 には MTO を用いた時の輸送挙動を示す。

図中では縦軸の左側は RR 値、右側には TR 値をプロットしている。両方とも炭素鎖が長くなると有機相への移行量が増加している。炭素鎖が長くなるほど、それ自体の疎水性が高くなることからこの結果は予測できる。

Table 4-1 The transport of ω -aminoalkanesulfonic acid and ω -aminocarboxylic acid through an organic liquid membrane after 6 hours. As the carrier, TOA or MTO was used.

Compound	TOA		MTO	
	RR(%)	TR(%)	RR(%)	TR(%)
C-2	17.0±0.6	46.5±2.1	10.8±1.2	38.0±4.9
C-4	8.8±1.9	57.4±2.3	6.9±2.7	58.0±3.1
C-6	0	64.5±1.0	0	58.3±0.8
C-8	0	20.3±3.0	0	33.7±1.6
C-10	0	27.0±4.0	0	35.8±8.8
A-2	*	*	78.4±3.5	16.7±1.6
A-4	89.9±0.6	5.6±0.4	67.4±3.0	25.9±1.8
A-7	13.7±0.8	54.3±5.3	5.1±0.8	60.5±1.2
A-10	0	29.4±4.3	0	48.1±2.2

The concentrations of the sample in phase I, TOA and MTO in the organic phase were 1, 1 and 5 mM, respectively. pH values of phase I and II were 12.5 and 5.0, respectively. *, not transported.

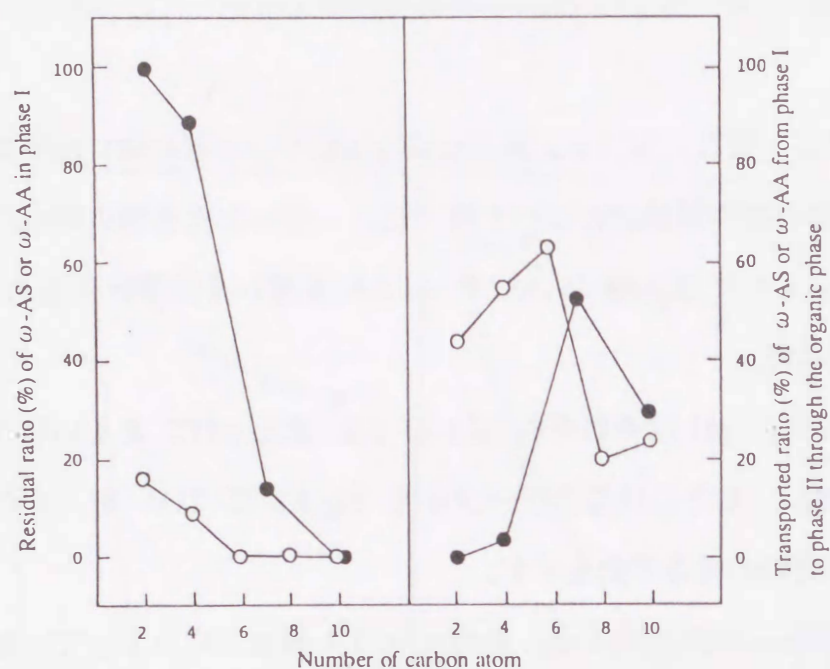


Fig. 4-5. The plot of the residual and transported ratios using TOA as the carrier against various numbers of carbon atoms in ω -AS or ω -AA. The initial concentrations of the sample and TOA were 1 and 10 mM, respectively. The pH values of phases I and II were 12.5 and 5.0, respectively. Data were obtained after 6 hours of reaction.

○ ω -AS, ● ω -AA

炭素鎖が比較的短い ($n = 2, 4$) とき、 ω -AS と ω -AA とでは有機相への移行量に大きな差がみられた。 $n=2$ では C-2 の RR 値は 17.0% (TOA)、10.8% (MTO)、A-2 のそれは 100% (TOA)、78.4% (MTO) となった。

また $n = 4$ では C-4 の RR 値は 8.8% (TOA)、6.9% (MTO)、A-4 のそれは 89.9% (TOA)、67.4% (MTO) となった。MTO を例にとると ω -AS は ω -AA に比べ、 $n =$ で約 4 倍、 $n=4$ で約 2.8 倍 有機相へ移行しやすかった。さらに n が増加すると ω -AS と ω -AA との RR 値の差が減少し、C-10 と A-10 ($n=10$) とではどちらのキャリアーを用いても 100% 有機相へ移行した (Fig. 4-5、4-6)。

TOA では A-4 と C-4 を比較すると、C-4 の方が約 8 倍有機相へ移行しやすかった。炭素数の少ないほど ω -AA より ω -AS のほうが移行性が高いことが見出された。

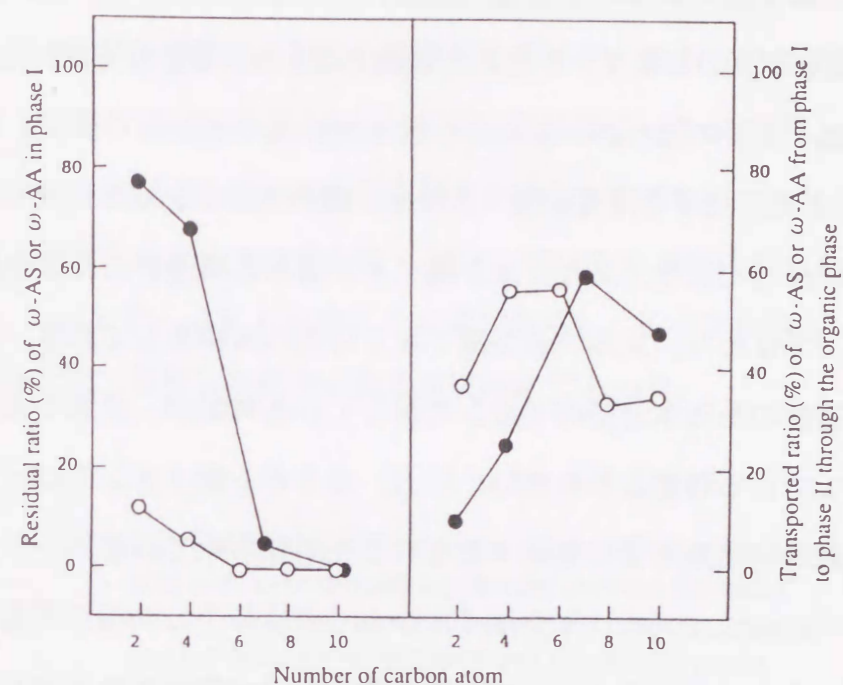


Fig. 4-6. The plot of the residual and transported ratios using MTO as the carrier against various numbers of carbon atoms in ω -AS or ω -AA. The initial concentrations of the sample and MTO were 1 and 10 mM, respectively. The pH values of phases I and II were 12.5 and 5.0, respectively. Data were obtained after 6 hours of reaction.

○ ω -AS, ● ω -AA

また全体的にみると TOA よりも MTO の方が移行能が良いことが再確認された。

一方、有機相を介しての相 1 から相 2 への輸送挙動をみると、輸送量は炭素鎖が比較的短い ($n = 2 \sim 6, 7$) 場合は有機相への移行量に依存して増加した。一方、 $n = 8$ 以上長い炭素鎖を有する C-8、C-10、A-10 では有機相から相 2 への輸送量が A-7 や C-6 より減少した。これら長い炭素鎖を有する化合物は十分な疎水性を獲得しているために、有機相に滞留しやすくなったと考えられる。全体として、TR 値は、

ω -AS : C-2 < C-4 < C-6 > C-8 = C-10
 ω -AA : A-2 < A-4 < A-7 > A-10

の順になった。

小原らは、第4級アンモニウム塩（塩化ドデシルオクチルメチルベンジルアンモニウム）を含むジクロロエタンを用いた有機アニオンの抽出性を調べた。その結果、スルホン酸イオンのほうが、カルボン酸イオンよりもかなり抽出され易いことを示した⁸⁵⁾。また、上平らは芳香属スルホン酸やカルボン酸水溶液の極限伝導度の温度依存性の検討により、スルホン酸イオンは水の構造をこわす性質があると報告している。すなわち、スルホン酸イオンは負の水和をしており、スルホン酸イオンの最近傍のある水分子のイオンに接している時間が、純水中の水分子が隣の水分子に接している時間よりも短い。一方、カルボン酸イオンではイオンのまわりの水分子は純水の水分子よりも動きにくいことが知られている。したがって、カルボン酸イオンのほうがスルホン酸イオンよりも水分子との相互作用が強いと推測されるので、スルホン酸イオンのほうが抽出過程の際脱水和エネルギー変化が小さく抽出性が大であると推測した⁸⁶⁾。

第4節 各種 ω -AS および ω -AA の液体膜輸送挙動と分配係数の関係

ω -AA や ω -AS を用いた輸送実験において、炭素鎖の長いものほど有機相への移行量が増加した。この原因に、これらの疎水性のみが影響していることが考えられるため、これらの分配係数を測定した。

分配係数 (p) は、二つのお互いに混じり合わない相の間で分配平衡させ、二つの相に含まれる物質の濃度の比として定義される。つまり、

$$p = \frac{C_o}{C_w}$$

ここで、 C_o は有機相中の溶質の濃度、 C_w は水相中の溶質の濃度である。本節では、分配係数の対数値を用い検討した。

ω -AA および ω -AS を水相と n -オクタノール間で分配平衡させたところ中性 pH では A-10 と C-10 がわずかに有機相へ移行しただけで、他のものの移行はみられなかった。また、水相の pH を十分に高くしても結果は同じであった^{87,88)}。

そこでイオン会合性試薬を用いて分配実験を行った。まず水溶性のイオン会合性試薬として、テトラブチルアンモニウム塩 (TBA) 10mM を水相に溶かし、水相の pH を 12.5 として ω -AA や ω -AS を完全にアニオン体にし、イオン会合させ、全体的に疎水性を増加させた。使用した試料の濃度は 2 mM であった。

Table 4-2 Partition coefficients of ω -aminoalkanesulfonic acid and ω -aminocarboxylic acid between the water phase containing 10mM TBA and the octanol phase and between the water phase and the octanol phase containing 10mM TOA.

Compound	TBA	TOA
C-2	-	-1.18±0.22
C-4	-	-0.88±0.09
C-6	-1.37±0.16	-0.15±0.06
C-8	-0.21±0.01	0.69±0.04
A-3	-	-1.21±0.05
A-4	-	-1.03±0.23
A-5	-	-0.46±0.03
A-7	-0.65±0.16	0.35±0.05

The concentrations of sample, TBA and TOA were 2, 10, 10 mM, respectively. The pH value of water phase was 12.5. The temperature was 30±0.5°C. - , not measured

この条件では、炭素鎖の短いものでは有機相へ移行せず、長い炭素鎖を有するもの (A-7, C-6, C-8) が有機相へ移行した。

次に、脂溶性イオン会合性試薬として、TOA を用いた。TOA の濃度を 10mM 含む n -オクタノール相と、試料 2 mM を含む pH 12.5 の水相と分配平衡させ、分配係数を求めた (Table 4-2)。TBA に比べ TOA を用いた時その輸送能は高く、また炭素鎖の長いほど疎水性が高くなること、また、全体的に ω -AS のほうが ω -AA より分

配係数が大きく、疎水性が高いことが分かり、液体膜輸送と同様の傾向を示した。液体膜輸送において用いた TOA の濃度は 5 mM であり、この条件で、C-6 より炭素鎖の長い ω -AS はすべて有機相に移行しているに対し、倍量の TOA を用いた分配実験では、分配係数が C-6 で -0.15、C-8 で 0.69 とそれぞれ約 50% と約 85% しか有機相へ移行していなかった。

液体膜システムにおいては、溶質が相 1 から有機相へ移行する場合、有機相から相 2 や相 2 から有機相への逆移行の影響も考慮に入れる必要がある。つまり、有機相に移行した溶質は、相 2 中の物質が有機相へ移行することにより、相 2 へ移行できるようになる。その結果、相 1 から有機相へ溶質の移行が容易になる。一方、2 相系（分配係数測定系）では、お互いに平衡に達した後は、それ以上両相間の濃度に変化はない。このように、2 相系では、有機相への移行量は試料の疎水性に影響されるが、液体膜システムにおける輸送においては、試料の疎水性と共に、相 2 中の物質の影響が無視できない。 ω -AS や ω -AA の液体膜輸送では、相 2 中のアニオン（おそらく酢酸イオン）との対向輸送により、濃度勾配に逆らった輸送が可能になったと考えられる。

以上のように、 ω -AA と ω -AS との液体膜輸送について検討し、タウリンの持つ分子性のため、同族体である β -アラニンよりも、輸送されやすいことが分かった。

生体では、タウリンなどのアミノ酸はキャリアーを介した輸送であり、これらは、生理的 pH で行われている。液体膜を用いた輸送でも、生理 pH 条件での輸送を行うことが今後の課題である。

結論

生体成分の中で、タウリンはアミノ基とスルホン基を持ち、その構造類似体である β -アラニンと比較すると、遷移金属や他の金属に対する錯体安定性が低く、そのアミノ基の塩基性が低いなどの性質を持っており、スルホン基を持つ物理化学的性質のユニークさがタウリンの生理活性と関係あるものと考えられる。

液体膜システムを用いた系では、タウリンおよび類似体（ ω -AA、 ω -AS）の有機相への移行は、中性 pH では不可能で、高 pH（pH 12.5）、そしてカチオン性キャリアーの存在下において可能であった。有機相への移行量は、炭素鎖の長いものほど増加した。これは疎水性が高いほど有機相への移行量が増すという分配係数の測定結果からも支持される。同じアミノエチル基（ $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ ）を有する β -アラニンとタウリンを比較すると、タウリンのほうが、 β -アラニンより、有機相への移行量が多かった。このことは、スルホン基とカルボキシル基の物理化学的性質の相違が原因と考えられ、スルホン基の持つユニーク性が認識された。つまり有機相へ抽出されやすいことであった。

このようにタウリンの種々の生理活性の発現には、これらユニークな性質を持つスルホン基が関与していることは十分に考えられた。

第5章 ポリアミンと液体膜との相互作用

ポリアミン (PA) はアミンを二つ以上含む直鎖の脂肪族アミンの総称であり、生物界に広く分布している。これらは細胞の増殖や維持に重要な役割を果たしていると考えられている⁸⁹⁻⁹³⁾。PA は生理 pH 条件では Ca^{2+} や Mg^{2+} のようにカチオンとして振る舞っているが、根本的な相違がある。それは PA の正電荷が構造的に自由のきく炭素鎖に隔てられた形で分散しているため、DNA⁹⁴⁾ や生体膜の酸性リン脂質や膜結合蛋白の負の荷電部分に橋わたしのように結合することにより種々の影響を及ぼしている³⁰⁾。

生体では、PA は生体膜の構成成分たとえばリン脂質などのリン酸部分のようなアニオンと強く結合しており、高い親和性のあることが観察されている^{95,96)}、また PA はリン酸イオンの輸送に影響を与えている^{97,98)}。



Putrescine (Put)



Spermidine (SP-3)



Spermine (SP-4)

Fig. 5-1. The structure of polyamines used in this study.

そこで、リン酸基を有するアニオン性キャリアーを含む液膜をモデル膜とし、PA とモデル膜との親和性や無機カチオンとの相互作用などについて検討を加えた。

有機相としてクロロホルムを用いた。無機カチオンとしてアルカリ土類金属やアルカリ金属を、PA として プトレシン (Put)、スペルミジン (SP-3)、スペルミン (SP-4) を用いた。今回用いた PA の構造を Fig. 5-1 に示す。

第1節 PA の分配係数⁹⁹⁾

PA の液体膜の有機相へ移行しやすさを調べるために、タウリン関連化合物と同様にこれらの分配係数の対数値を求めた。

Table 5-1. Partition coefficients of polyamines

Compound	pH 12.5 (no DDP)	pH 7.2 (5mM DDP)
Putrescine	-0.55 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Spermidine	-0.42 ± 0.07	0.36 ± 0.06
Spermine	-0.37 ± 0.07	0.44 ± 0.02

The solvent was octanol. The temperature was 30 ± 0.5°C. DDP was didodecylphosphoric acid. The concentration of polyamines was 1 mM.

3種 PA は、どれも中性 pH では有機相へ移行せず、高い pH (11.5 以上) の領域では移行が可能であった。これは、pH 中性 では、アミノ基 (-NH₂) や イミノ基 (-NH-) が親水性の (-NH₃⁺) や (-NH₂⁺-) となって全体として、疎水性が低くなっているためである。一方、高い pH 領域では、窒素原子に結合したプロトンが解離し、疎水性が高くなったため、有機相への移行が可能となったと考えられる。

一方、脂溶性リン酸化合物（ジドデシルリン酸、DDP）を含む有機相を用いると、ポリアミンは生理的 pH（7.2）の条件でも、有機相へ移行した。これは、有機相のリン酸化合物のプロトンとカチオン性 PA が交換し、有機相への移行が可能になったことによると考えられる。

Table 5-1 に、3種 PA について、何も含まない有機相と pH 12.5 の水相、及び DDP を含む有機相と pH 7.2 の水相で分配平衡させ、得られた分配係数を示した。

分配係数の対数値

pH 12.5 - 有機相 (no DDP) : SP-4 (-0.37) > SP-3 (-0.45) > Put (-0.55)

pH 7.2 - 有機相 (DDP) : SP-4 (0.44) > SP-3 (0.36) > Put (0.04)

となり、両系とも SP-4 が一番大きい値を示し、有機相への移行量の増大がみられた。DDP を含まない系では、Put、SP-3、SP-4 間の分配係数の差は約 0.1 と一定であった。Put に対し、SP-3 では $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、また SP-3 に対し、SP-4 では $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ とほぼ同じ程度の疎水性基が増えていることから、同程度の疎水性を獲得したものと思われる。しかしながら、DDP を含む系では、これらの分配係数の差は Put と SP-3 では約 0.3 で、SP-3 と SP-4 ではほとんど差がないことから、Put と SP-3 や SP-4 とでは DDP に対する親和性に差があることが考えられる。

このように、PA は中性 pH 条件でも脂溶性リン酸化合物を含む有機相へは容易に移行できることが分かり、SP-3 や SP-4 は Put に比べ、脂溶性リン酸基との親和性に差があることが分かった。

第2節 キャリアー濃度と PA の輸送との関係

PA が相 1 から有機相へ移行する様子とさらに、有機相から相 2 への移行に相 2 に添加する物質がどのように影響するかを検討した。

初めに、相 1 から有機相への移行に、キャリアー濃度がどのように影響するのかを調べた。両相の pH を 7.2 とし相 1 に PA として SP-4 1 mM を入れ、キャリアー濃度の変化が輸送に及ぼす影響を観測した。この実験では、脂溶性リン酸化合物として、ジー（2-エチルヘキシル）リン酸 (Fig. 3-1.) を用いた。

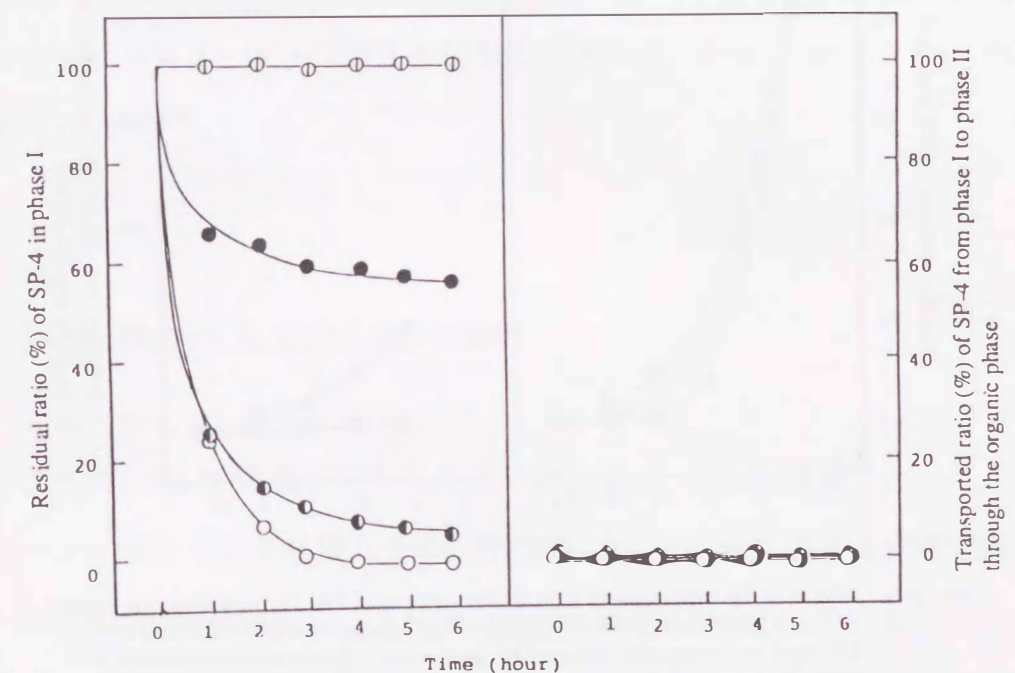


Fig. 5-2. Effects of the EHP concentration on the transport of SP-4. The initial concentration of SP-4 in phase I was 1 mM. The pH values of phases I and II were both 7.2. Residual and transported ratios of SP-4 were plotted against the reaction time.
○ 0 mM, ● 2 mM, ● 6 mM, ○ 10 mM

Fig. 5-2 では横軸に反応時間、縦軸の左側では RR 値を、そして右側では TR 値を示す。

キャリアが存在しないと SP-4 は有機相に移行せず、EHP の濃度が高くなるにつれて有機相への移行量が増大した。そして 10 mM EHP では4時間後有機相へ 100% 移行した。しかしながら測定したすべての濃度においても、SP-4 の有機相を介して相1から相2への輸送は見られなかった。

さらに他の PA (Put、SP-3) を用い、EHP 濃度変化に対する輸送挙動を調べた (Fig. 5-3)。この図において横軸は EHP の濃度を、そして 6 時間反応後の RR 値および TR 値をプロットした。

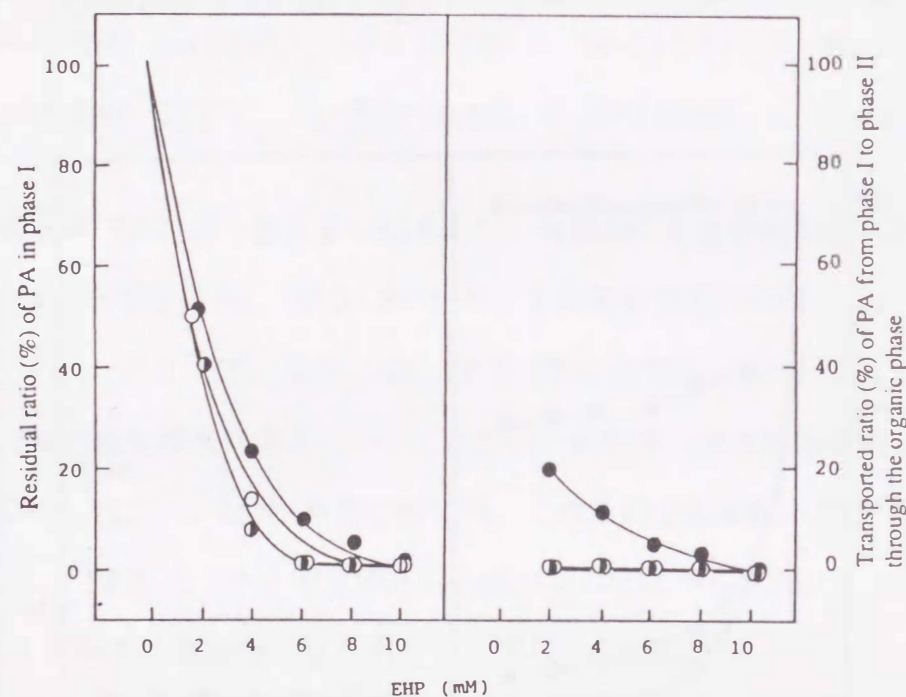


Fig. 5-3. Effects of the EHP concentration on the transport of PA. The initial concentration of PA in phase I was 1 mM. The pH values of phases I and II were both 7.2. Residual and transported ratios of PA were plotted against the concentration of EHP. Data were obtained after 6 hours of reaction.
● Put, ○ SP-3, ● SP-4

SP-4 同様に EHP 濃度の上昇に伴って相1から有機相への移行が増加し、EHP 10 mM では PA が 6 時間後有機相へ 100% 移行した。また、EHP 2~4 mM では PA 間で有機相への移行量に差が認められ、SP-4 が最も移行しやすく SP-3、次で Put と減少した。

これらの結果、SP-4 が最も EHP に対し親和性が高く、Put が最も低いことが分かった。このことは、Put が低い EHP 濃度において有機相を介して相1から相2へわずかながら輸送されていることから推測できる。このように窒素含有量の多い PA ほど EHP に対する親和性が高いことが分かった。

木村らは¹⁰⁰⁾多くの直鎖および環状の含窒素化合物を用い、リン酸基を含む化合物 (アデノシン-1-リン酸、アデノシン-2-リン酸、アデノシン-3-リン酸) に対する親和性を検討した結果、窒素原子間の炭素鎖が長く窒素原子の多いほど、また直鎖化合物より、環状化合物ほどこれらとの親和性が高いことを示した。

そしてリン酸基含有化合物に対する親和性の強さは、SP-4 > SP-3 であった。PA の生体膜輸送において、いくつかのトランスポーターが関与し、さまざまな実験結果からこのトランスポーターに対する親和性の強さは、SP-4 > SP-3 > Put であると報告されている^{101~103)}。

第3節 PA 輸送に対する Ca²⁺イオンの影響

上記のように、PA の有機相を介した相1から相2へ輸送は困難であった。そこでアンチポートイオンとして無機カチオンを用い、PA の輸送に対する影響を調べた。Fig. 5-4 には反応時間に対する RR 値および TR 値をプロットしている。Ca²⁺イオン添加により、PA が有機相を介して相1から相2へと移行した。またその輸送量は 6 時間後 Put > SP-3 > SP-4 の順であった。

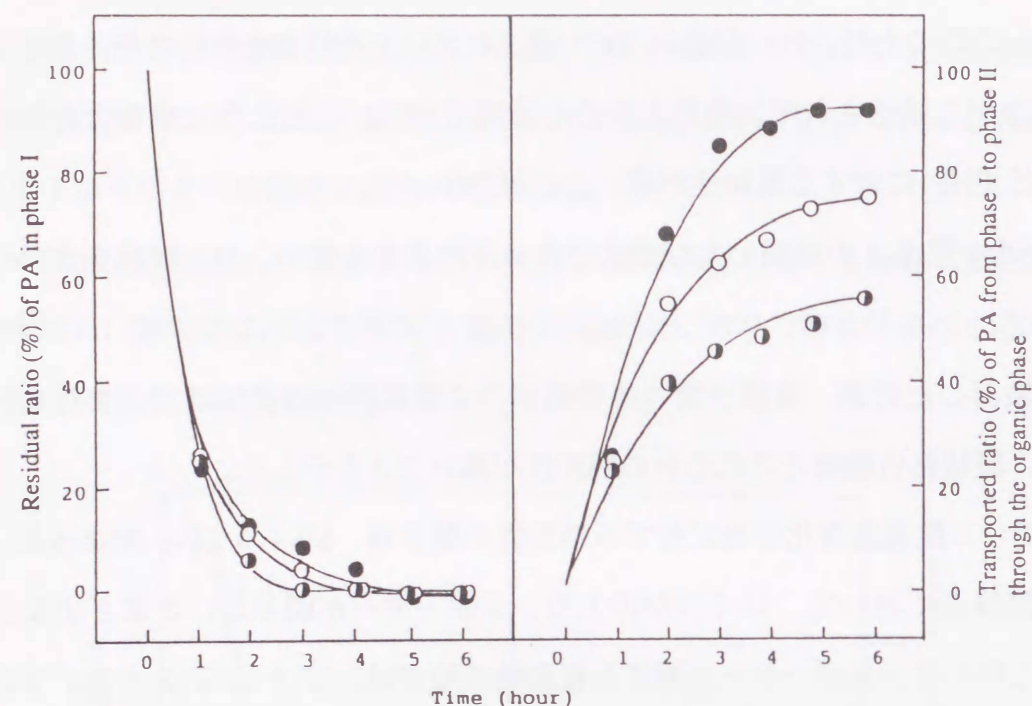


Fig. 5-4. The presence of Ca^{2+} in phase II stimulates the transport of PA from the organic phase to phase II. The initial concentrations of PA in phase I, Ca^{2+} in phase II and EHP in the organic phase were 1, 10 and 10 mM, respectively. pH values of phases I and II were both 7.2. Residual and transported ratios are plotted against the reaction time

● Put, ○ SP-3, ◐ SP-4

さらに Ca^{2+} イオンの濃度を変化させた場合の、PA の輸送挙動を調べた (Fig.5-5)。図中では6時間反応後の TR 値をプロットしている。Put ではその濃度の 2.5 倍量である 2.5 mM Ca^{2+} イオンの添加で、初期相 1 中の量の約 45%、さらに 10 倍量 (10 mM) の Ca^{2+} イオンを添加で、ほぼ 95% が相 2 へ輸送された。また SP-3 では Ca^{2+} イオンの添加が増加するに従い輸送量が増加し、20 mM 添加では Put と同程度の輸送量を示した。一方、SP-4 においては、その濃度の 20 倍量 (20 mM) の Ca^{2+} イオンの添加においても、初期濃度の約 80% の輸送にとどまった。このことから SP-4 がキャリアーであるリン酸イオンと強く結合していることが示唆された。

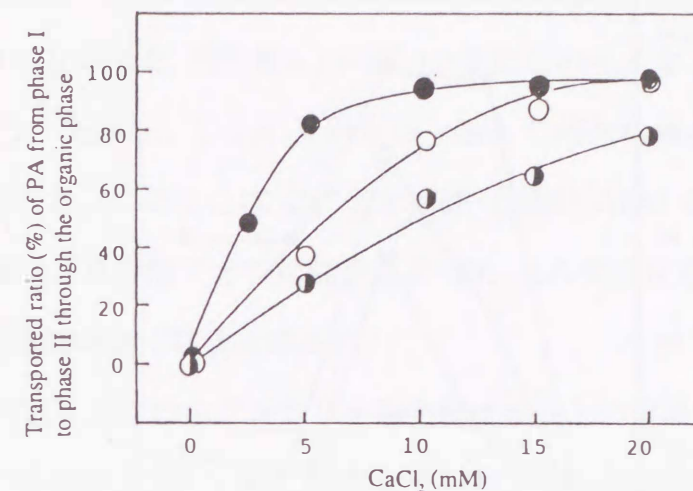


Fig. 5-5. Effects of the Ca^{2+} concentration in phase II on the transport of PA from the organic phase to phase II. The initial concentrations of PA and EHP were 1 and 10 mM, respectively. The pH values of phases I and II were both 7.2. The transported ratio of PA was plotted against the concentration of Ca^{2+} . Data were obtained after 6 hours reaction.

● Put, ○ SP-3, ◐ SP-4

第4節 PA 輸送に対する種々のアルカリ土類金属イオンの影響

上記のように Ca^{2+} イオンが PA の輸送に影響を及ぼすことが分かったので、他のアルカリ土類金属イオン (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} : AEM)を用い比較検討した。Fig.5-6 には AEM 10 mM を相 2 へ添加し、6時間反応後の TR 値をプロットしている。PA 1 mM、EHP 10 mM そして両水相の pH を 7.2 とした。

また Table 5-2 にはそれぞれの AEM 添加による6時間反応後の TR 値を列記した。それぞれの AEM に対する PA の TR 値は

Put	:	Ca^{2+} (92.6%)	=	Mg^{2+} (90.7%)	>	Sr^{2+} (59.4%)	=	Ba^{2+} (62.2%)
SP-3	:	Ca^{2+} (76.7%)	>	Mg^{2+} (46.4%)	>	Sr^{2+} (14.9%)	=	Ba^{2+} (17.6%)
SP-4	:	Ca^{2+} (44.8%)	>	Mg^{2+} (19.9%)	>	Sr^{2+} (2.0%)	=	Ba^{2+} (2.7%)

となった。

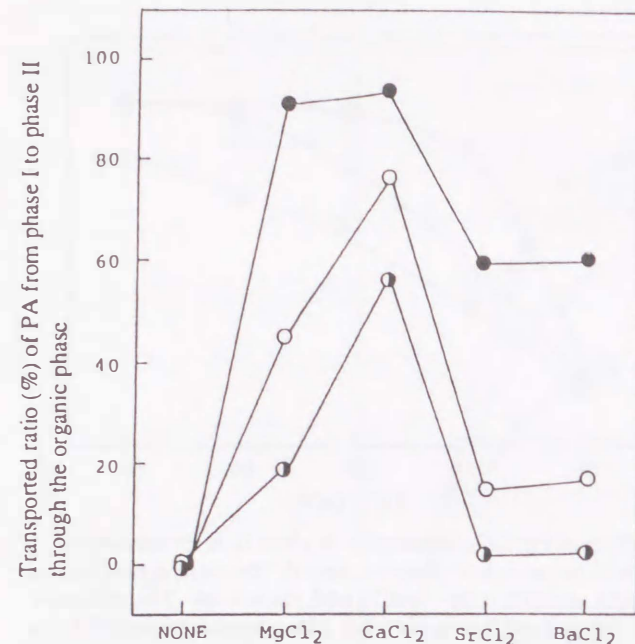


Fig. 5-6. Effect of the presence of alkaline earth metal ion in phase II on the transported ratios of Put, SP-3 and SP-4. The initial concentration of PA in phase I, EHP in the organic phase, and the alkaline earth metal ion in phase II were 1 mM, 10 mM and 10 mM, respectively. The pH values of phases I and II were both 7.2. Data were obtained after 6 hours of reaction.

● Put, ○ SP-3, ◐ SP-4

Table 5-2. The transported ratios of polyamine after the addition of alkaline earth metal ions in phase II

Compound	MgCl ₂	CaCl ₂	SrCl ₂	BaCl ₂
Putrescine	90.7 ± 6.6	92.6 ± 3.0	59.4 ± 3.9	62.2 ± 8.1
Spermidine	46.4 ± 1.6	76.7 ± 3.3	14.9 ± 1.5	17.6 ± 0.9
Spermine	19.9 ± 0.5	44.8 ± 7.4	2.0 ± 0.8	2.7 ± 1.2

The initial concentrations of polyamines in phase I and EHP in the organic phase were 1 and 10 mM, respectively. The concentration of the alkaline earth metal ion in phase II was 10 mM. The pH values of phases I and II were both 7.2. Data were obtained after 6 hours of reaction.

このように、Mg²⁺ や Ca²⁺イオンは有効な輸送促進能を持っていた。SP-3 や SP-4 を用いた時、Mg²⁺ と Ca²⁺イオンではこれらの輸送促進能に明らかに差が見られ、Ca²⁺ の高い輸送促進能が観察された。またこのような現象は Put では観測されなかった。

一方、Sr²⁺ や Ba²⁺イオンではこれらの輸送促進能は明らかに低く、SP-4 の輸送はほとんど観測されなかった (TR 値= 2~3%)。またこれらイオンの輸送促進能に差は見られなかった。全体として PA に対する AEM の相対的輸送能は、Ca²⁺ > Mg²⁺ > Sr²⁺ = Ba²⁺ となった。このことは Ca²⁺イオンが 4種の AEM ので最もリン酸イオンとの親和性が強く、リン酸イオンに結合した PA との交換反応も容易に起こり、結果として輸送促進能が高くなると考えた。

この考えは、EHP とこれらアルカリ土類金属イオンとの溶媒抽出の実験結果から、抽出されやすさは Ca²⁺ > Sr²⁺ > Ba²⁺ の順に低くなっていることから¹⁰⁴⁾、また、リン脂質であるフォスファチジルセリンを含むベシクルに対し Mg²⁺より Ca²⁺のほうが親和性が高い¹⁰⁵⁾ ことから支持された。

第5節 PA 輸送に対する種々のアルカリ金属イオンの影響

本章では、アルカリ金属イオン (Li⁺, Na⁺, K⁺; AM) を相2に添加し、PA の輸送を調べた。液体膜システムの条件は AEM を用いた時と同様であった。AEM に比べ十分な PA の輸送が観測できるのに 1 M 必要であった。そこで3種の AM を 1M の濃度で相2に添加し輸送実験を行った。Fig. 5-7 と Table 5-3 にはそれぞれの AM に対する6時間反応後の TR 値をプロットおよび列記した。

最も高い輸送促進能を有するのは Li⁺ イオンであり、Na⁺ や K⁺ イオンに対するそれはほとんど同じであった。AM 添加による PA の TR 値は

Put : Li⁺ (90.7%) > Na⁺ (70.4%) = K⁺ (66.8%)
 SP-3 : Li⁺ (86.2%) > Na⁺ (29.5%) = K⁺ (29.3%)
 SP-4 : Li⁺ (67.7%) > Na⁺ (11.6%) > K⁺ (5.8%)

となった。

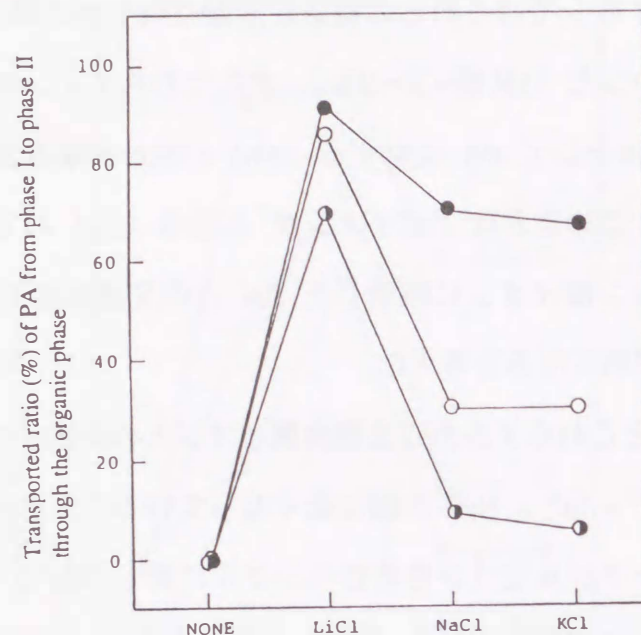


Fig. 5-7. Effect of the presence of alkaline metal ion in phase II on the transported ratios of Put, SP-3 and SP-4. The initial concentration of PA in phase I, EHP in the organic phase, and the alkaline metal ion in phase II were 1 mM, 10 mM and 1 M, respectively. The pH values of phases I and II were both 7.2. Data were obtained after 6 hours of reaction.

Table 5-3. The transported ratios of polyamines after the addition of alkaline metal ions in phase II

Compound	LiCl	NaCl	KCl
Putrescine	90.7 ± 6.3	70.4 ± 0.7	66.8 ± 3.7
Spermidine	86.2 ± 2.3	29.5 ± 4.6	29.3 ± 3.4
Spermine	67.7 ± 4.6	11.6 ± 2.3	5.8 ± 1.4

The initial concentrations of polyamines and EHP were 1 and 10 mM, respectively. The concentration of alkali metal ion was 1 M. The pH values of phases I and II were both 7.2. Data were obtained after 6 hours reaction.

このような結果から、SP-4 が最も輸送され難く、Put が最も輸送されやすいという、AEM 添加と同様の結果が得られた。これら AM の低い輸送促進能は、EHP との親和性の弱さに基づいていると考えられた。このことは EHP と AM との親和性が

$Ba^{2+} > Na^{+} > K^{+}$ ¹⁰⁴⁾ と低くなっていることから支持された。これらの結果、PA の生理機能に対し AM よりも AEM の方 (特に Ca^{2+} や Mg^{2+} イオン) が重要であることが示唆された。

例えば、内向き整流 K^{+} チャンネルの外向き電流の抑制は、チャンネルに PA が結合して起きるが、 Mg^{2+} と PA の作用は拮抗することが知られている¹⁰⁶⁾。SP-4 はプロテインキナーゼ C の活性を阻害することが報告されている。この酵素は膜中のリン脂質、ジアシルグリセロールそして Ca^{2+} イオンとの複合体形成により活性化され、SP-4 がこの複合体の Ca^{2+} イオンと交換することにより阻害すると考えられている。この作用の強さは SP-4 > SP-3 > Put の順に減少している¹⁰⁷⁾。

SP-3 や SP-4 はラットの肝臓や脳から単離されたミトコンドリアでの Ca^{2+} 輸送の制御に重要な役割を果たしている^{108,109)}。

以上のように、PA は分散した正電荷をもっている故に、生体内アニオンに対する作用は、無機イオン (Ca^{2+} や Mg^{2+} イオン) とは異なっている。本モデル膜による PA の輸送実験の結果、 Ca^{2+} や Mg^{2+} イオンが PA の輸送に大きく影響を与えていることが明らかになった。液体膜を用いた本研究は、生体内で PA と無機イオン (Ca^{2+} や Mg^{2+} イオン) とが互いに影響を及ぼしあっているという事実を考える際に大きな示唆を与えるものであった。

このように、膜内構成物質とそれに親和性の高い物質との相互作用、また、他の同類化合物との相互作用などを調べるために液体膜を用いることは、今後、種々のキャリアーや適当な溶媒を用いることにより、広く応用できることが期待される。

結論

生体では、PA は生体膜のアニオン性構成成分と相互作用することにより、その生

理作用に寄与している。Ca²⁺、Mg²⁺などの無機カチオンがこれらの作用に影響を与えていることから、PAと無機カチオンとは膜中アニオン部位にどのように作用しているかを、アニオン性キャリアーを含む液体膜をモデル膜として用い検討した。

膜は疎水性のため、PAの疎水性の程度を調べるため分配係数を測定したところ、生理的pHでは、有機相へは移行せず、高pHで有機相へ移行した。しかしながら、脂溶性リン酸化合物を含む有機相には生理的pHでも有機相へ移行した。これらの条件で、分配係数を測定したところ、その値は、Put < SP-3 < SP-4順に大きくなり、SP-4が一番有機相へ移行しやすかった。

さらに、アニオン性部位に対する相互作用を調べるため、脂溶性リン酸化合物(EHP)を含む液体膜システムを用い検討した。両相のpHを7.2とし、相1にPAを入れ、その10倍濃度のEHPを用いると、これらは、有機相へ完全に移行し、相2へは輸送しなかった。

無機イオンとPAとの、アニオン部位に対する相互作用を調べるため、相2に種々無機イオン(アルカリ金属：Li⁺、Na⁺、K⁺、アルカリ土類金属：Mg²⁺、Ca²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺)を添加しPAの相2への輸送の程度を調べた。代表としてCa²⁺を用いたところ、濃度依存的に、PAの輸送が見られた。しかし、PA間ではその差がみられ、SP-4 < SP-3 < Putの順に輸送量が増加した。他の無機イオン(Mg²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺)を用いても、この順は変わらなかった。

また、SP-3やSP-4の相2への輸送量では、これら無機イオン間で差が見られ、輸送促進能はBa²⁺ = Sr²⁺ < Mg²⁺ < Ca²⁺の順になり、Ca²⁺が一番高かった。

一方、アルカリ金属では、アルカリ土類金属ほど輸送促進能は高くなく、有効に輸送させるのにアルカリ土類金属の100倍濃度が必要であった。

これらの結果、リン酸基への親和性は、Put < SP-3 < SP-4と塩基性基が多くなるほど高くなること、無機イオンとして特に、Ca²⁺やMg²⁺などは、PAの膜構成物質との相互作用に影響を与えていることなど、生理学的事実に対応した結果が得られた。

以上、液体膜を用いたこのような実験は、膜構成物質に対する相互作用を調べる装置として利用できることがわかり、新しい利用法として期待される。

実験の部

第1章

試薬

L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-オルニチン1塩酸および他のL-アミノ酸、そしてジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) は半井テスクの特級の製品を用いた。クロロホルムも半井テスクの製品で、蒸留して用いた。他の試薬はすべて特級品であった。

液体膜輸送

Fig. 1 に示した U-字型管の低部に AOTを含むクロロホルム溶液 (25 ml) を入れ、相 1 にはアミノ酸 1 mM を含む緩衝液 (20 ml) を、相 2 には適当な緩衝液 (20 ml) を入れた。有機相をマグネチックスターラーで緩やかに回転させた。反応は室温で行った。アミノ酸の濃度はオルトフタルアルデヒド-メルカプトエタノールを用いた蛍光法により定量した。蛍光測定は島津の蛍光光度計 RF-540 を用いた。

pH 2.0~3.0 の緩衝液は 0.1 M 塩酸と 0.1 M 酢酸ナトリウムにより、pH 4.0~6.0 は 0.1 M 酢酸と 0.1 M 酢酸ナトリウムにより、pH 7.2~9.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 塩酸により、そして pH 10.0~12.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 水酸化ナトリウムによりそれぞれ調製した。pH 1 は 0.1 M の塩酸を用いた。

輸送挙動は Residual ratio (RR) (1), Transported ratio (TR) (2) の値を用い検討した。

$$RR = C_{1t} / C_i \times 100 (\%) \quad \text{----- (1)}$$

$$TR = C_{2t} / C_i \times 100 (\%) \quad \text{----- (2)}$$

ここで、 C_i はサンプルの初期濃度、そして C_{1t} および C_{2t} は t 時間反応後のそれぞれ相 1、相 2 におけるサンプルの濃度を示している。

第2章

試薬

ヒスタミン (2 塩酸塩)、L-ヒスチジン、ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) は半井テスクの特級品を用いた。ヒスチジノール、ヒスチジノールリン酸およびカルノシン (β -アラニルヒスチジン) はシグマ社の製品を、そして他の試薬はすべて特級品を用いた。

液体膜輸送

Fig. 1 に示した U-字型管の低部に AOT を含むクロロホルム溶液 (25ml) を入れ、相 1 にはヒスチジンまたはヒスチジン誘導体 1 mM 溶液 (20 ml) を、相 2 には適当な緩衝液 (20 ml) を入れた。有機相をマグネチックスターラーで緩やかに回転させた。反応は室温で行った。ヒスチジン、ヒスタミンおよびヒスチジン誘導体はオルトフタルアルデヒド-メルカプトエタノールを用いた蛍光法により定量した。

pH 4.0~6.0 の緩衝液は 0.1 M 酢酸と 0.1 M 酢酸ナトリウムにより、pH 7.2~9.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 塩酸により、そして pH 10.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 水酸化ナトリウムによりそれぞれ調製した。

装置

蛍光測定は島津蛍光高度計 RF-540 を用いた。液体クロマトグラフィの装置は柳本液体クロマトグラフモデル L-2000 とポンプユニット PN-101、検出器は日本分

光の UVIDE-100IV を用いた。測定波長は 220 nm とした。分離カラム (15 X 0.4 cm) で充填剤は Nucleosil 5 C₁₈ (5 μm)、そして溶離液は 15% (V/V) メタノールを含む 0.05 M リン酸-5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液を用いた。

輸送挙動は 第 1 章と同様の Residual ratio (RR) (1), Transported ratio (TR) (2)の値を用い検討した。

第 3 章

試薬

L-ヒスチジン、ヒスタミン (2 塩酸塩) およびジ-2-エチルヘキシルリン酸 (EHP) は半井テスクの製品を用いた。ヒスチジンデカルボキシラーゼ (HD) (EC 4.1.1.22, Lactobacillus 30 α, 0.33u/mg) はシグマ社の製品を用いた。他の試薬はすべて特級品を用いた。

液体膜輸送

Fig. 1 に示した U-字型管の低部に EHP を含むクロロホルム溶液 (25 ml) を入れ、相 1 にはヒスチジン 1 mM の HD 用緩衝液 (20 ml) を、相 2 には適当な緩衝液 (20 ml) を入れた。有機相をマグネチックスターラーで緩やかに回転させた。反応は室温および 35℃ で行った。ヒスチジンおよびヒスタミンはオルトフタルアルデヒド-メルカプトエタノールを用いた蛍光法により定量した。

HD 用緩衝液は 11.5 ml 酢酸、0.9 g EDTA を 500 ml の水に溶かし、1 M KOH 56 ml を加え全量を 1000 ml とした⁵⁹⁾。

pH 7.2~9.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 塩酸により、そして pH 10.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 水酸化ナトリウムによりそれぞれ調製した。

装置

蛍光測定は島津蛍光高度計 RF-540 を用いた。液体クロマトグラフィの装置は倉橋技研のポンプユニット PRS-2000、検出器として日本分光の UVIDE-100IV を用いた。測定波長は 220 nm とした。分離カラム (15 X 0.4cm) で充填剤は Nucleosil 5C₁₈ (5 μm)、そして溶離液は 15% (V/V) メタノールを含む 0.05 M リン酸-5 mM ヘキサンスルホン酸ナトリウム溶液を用いた。

第 4 章

試薬

タウリン (2-アミノエタンスルホン酸)、3-アミノプロパン酸、5-アミノペンタン酸、11-アミノウンデカン酸は半井テスク、8-アミノオクタン酸はシグマ社からそれぞれ購入した。他の ω-アミノアルカンスルホン酸は堀坂和敬教授 (神戸薬科大学・薬理学教室) からの恵与された物を用いた。臭化テトラオクチルアンモニウムは半井テスク、塩化メチルトリオクチルアンモニウムは関東化学の製品を用いた。クロロホルムは半井テスクの製品で、蒸留して用いた。他の試薬は全て特級品であった。

液体膜輸送

Fig. 1 に示した U-字型管の低部に EHP を含むクロロホルム溶液 (25ml) を入れ、相 1 には ω-アミノカルボン酸または ω-アミノアルカンスルホン酸 1 mM を含む緩衝液 (pH 12.5, 20 ml) を、相 2 には 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0, 20 ml) を入れた。有機相はマグネチックスターラーで緩やかに回転させた。反応は室温で行った。試料はオルトフタルアルデヒド-メルカプトエタノールによる蛍光法により

定量した。蛍光測定は島津蛍光分光光度計 RE-450 を用いた。

pH 8.0~9.0 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 塩酸により、そして pH 10~12.5 は 0.1 M ホウ酸ナトリウムと 0.1 M 水酸化ナトリウムによりそれぞれ調製した。

分配係数の測定

試料 1 mM および臭化テトラブチルアンモニウム 10 mM を含む緩衝液 (pH 12.5, 5 ml) を水層とし、n-オクタノール 5 ml を油層とした場合、及び試料 1 mM を含む緩衝液 (pH 12.5, 5 ml) を水層とし、10 mM 臭化テトラオクチルアンモニウムを含む n-オクタノール 5 ml を油層とした場合、それぞれ油層と水層を 50 ml 共栓フラスコに入れ、インキュベーター中 (30±0.5℃) で、8時間振とうした。振とう後、水層 0.1 ml をとり、o-フタルアルデヒド-メルカプトエタノールによる蛍光法により定量した。緩衝液及び機器は上記のものを用いた。

化合物の振とう前の水層中の濃度(Ci) と振とう後の水層中の濃度 (Cw) の差が油層へ移行したものとして、分配係数の対数値を求めた。

$$\text{分配係数の対数値} = \log [(C_i - C_w) / C_w]$$

第5章

試薬

ポリアミン「プトレシン (2 塩酸塩)、スペルミジン (3 塩酸塩) およびスペルミン (4 塩酸塩)」はシグマ社から購入した。ジ-2-エチルヘキシルリン酸 (EHP) は半井テスク、ジドデシルリン酸 (DDP) は文献に従って合成した¹¹⁰⁾。クロロホル

ムは半井テスクの製品で、蒸留後用いた。アルカリ金属 (塩化リチウム (無水物)、塩化ナトリウム、塩化カリウム)、アルカリ土類金属 (塩化マグネシウム 6 水和物、塩化カルシウム 2 水和物、塩化ストロンチウム 6 水和物、塩化バリウム 6 水和物) は半井テスクの特級品を用いた。他の試薬は全て特級品を用いた。

分配係数の測定

ポリアミン 1 mM を含む緩衝液 (pH 12.5, 5 ml) を水層とし、n-オクタノール 5 ml を油層とした場合、及びポリアミン 1 mM を含む緩衝液 (pH 7.2, 5 ml) を水層とし、5 mM DDP を含む n-オクタノール 5 ml を油層とした場合、それぞれ油層と水層を 25 ml 共栓フラスコに入れ、インキュベーター中 (30±0.5℃)、8時間振とうさせた。振とう後、水層を 0.1 ml とり残存するポリアミンを o-フタルアルデヒド-メルカプトエタノールによる蛍光法により定量した。

pH 12.5 の緩衝液は 0.1 M ホウ酸-0.1 M 水酸化ナトリウムから、また pH 7.2 の緩衝液は 0.1 M ホウ酸-0.1 M 塩酸からそれぞれ、調製した。蛍光測定は蛍光光度計 RF-540 を使用した。

液体膜輸送

Fig. 1 に示した U-字型管の低部に EHP を含むクロロホルム溶液 (25 ml) を入れ、相 1 にはポリアミン 1 mM を含む緩衝液 (pH 7.2, 20 ml) を、相 2 にはアルカリ金属またはアルカリ土類金属を含む緩衝液 (pH 7.2, 20 ml) を入れた。有機相はマグネチックスターラーで緩やかに回転させた。反応は室温で行った。ポリアミンはアルトフタルアルデヒド-メルカプトエタノールによる蛍光法により定量した。蛍光測定は上記の機器を用いた。

pH 7.2 緩衝液は、0.1 M 塩酸と 0.1 M ホウ酸ナトリウム溶液を混合して調製した。

引用文献

- 1) 寺本正明、膜、**13**, 13 (1988)
- 2) 清水剛夫、軽部正夫、吉川正和、民谷学、膜学実験シリーズ、第2巻、生体機能類似膜、p115, 共立出版, 1994
- 3) M.P.Thien and T.A. Hatton, *Sep. Sci. Technol.*, **23**, 819 (1988)
- 4) J.J. Pellegrino and R.D. Noble, *Trends Biotechnol.*, **8**, 216 (1990).
- 5) 中村重人、秋葉健一、ぶんせき、875 (1991).
- 6) 中塩文行、後藤雅弘、石油学会誌、**33**, 267 (1990).
- 7) Y.Kuo and H.P. Gregor, *Sep. Sci. Technol.*, **18**, 421 (1983).
- 8) M. Teramoto, H. Mastuyama, N. Ohnishi, S.Uwagawa and K.Nakai, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **33**, 341 (1994).
- 9) J. P Behr and J.M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6108 (1973)
- 10) P. L. Luisi, F.J. Bonner, A. Pellegrini, P. Wiget and R. Wolf, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 740 (1979)
- 11) H. Tsukube, *J. Chem. Soc. Perkin Trnas. I*, 2359 (1982),
- 12) H. Tsukube, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 29 (1983),
- 13) J. Rebek Jr., B. Askew, D. Nemeth and K. Parris, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2432 (1987),
- 14) P. Scrimin, U. Tonellato and N. Zenta, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4967 (1988),
- 15) A. Galan, D. Andreu, A.M. Echavarren, P. Prados and J. de Mendoza, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1511 (1992).
- 16) T. Shinbo, K. Nishimura, T. Yamaguchi and M. Sugiura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, 349 (1986).
- 17) T. Shinbo, K. Nishimura, T. Yamaguchi M. Sugiura, Paper presented at Int. Congr. Membranes and Membrane Processes, Tokyo, p813, 1987,
- 18) M.F.Paugan and B.D Smith, *Tetrahedron Lett.* **34**, 3723 (1993).
- 19) I. Tabushi, Y. Kobuke and J. Imuta, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 6152 (1981)
- 20) P.E. Sholander, *Science*, **131**, 585 (1960).
- 21) W.J. Ward, and W.L. Robb, *Science*, **156**, 1481 (1967).
- 22) W.J. Ward, *AIChE J.*, **16**, 405 (1970).
- 23) D.W. Armstrong and W. Li, *Anal. Chem.*, **60**, 86 (1988)
- 24) K.E. Goklen and T.A. Hatton, *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 831 (1987).
- 25) N.N.Li, USP, 3410794 (Nov. 12, 1968)
- 26) R.D. Hughes, E.F. Steigelman and J.A. Mahoney, Paper 1d presented at 1981, AIChE Spring National Meeting (1981).
- 27) J.H. Moore and R.S. Schechter, *Nature*, **222**, 476 (1969).
- 28) 杉浦正昭, 表面, **19**, 412 (1981)
- 29) 新保外志夫, 膜, **13**, 153 (1988).
- 30) F. Schuber, *Biochem. J.*, **260**, 1 (1989)
- 31) E. L. Cussler, D. F. Evans and M. H. Matesich, *Science*, **172**, 377 (1971).
- 32) D. K. Shiffer, A. Hochhauser, D. F. Evans and E. L. Cussler, *Nature*, **250**, 484 (1974).
- 33) K. Akiba and S. Hashimoto, *Anal. Sci.*, **2**, 541(1986).

- 34) A. Ohki, M. Takagi and H. Ueno, *Chem. Lett.* 1591 (1980)
- 35) M. Igawa, M. Tanaka and S. Izumi, *Nippon Kagaku-kaishi*, 135 (1980)
- 36) K. Maruyama, H. Tsukube and T. Araki, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5197 (1982)
- 37) H. Tsukube, K. Takagi, T. Higashiyama, T. Iwachido and N. Hayama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 2021 (1986).
- 38) T. A. Hatton, *ACS Sym. Ser.*, **342**, 170 (1987).
- 39) A. E. Martell and R. M. Smith eds., *Critical Stability Constants*, Vol. 1 Amino acids, Academic Press, New York, 1974.
- 40) A. C. Andrews and D. M. Zebolsky, *J. Chem. Soc.*, 742 (1965).
- 41) G. Brooks and L. D. Pettit, *J. Chem. Soc Dalton Trans.*, 42 (1976)
- 42) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, *Chem Rev.*, 525 (1971).
- 43) C. Hansch and W. J. Dunn III, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1 (1972)
- 44) C. Hansch and J. M. Clayton, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1 (1973).
- 45) V. Pliska, M. Schmidt and J.L. Fauchere, *J. Chromatogr.*, **216**, 79 (1981).
- 46) E. Kimura, C. Dalimunte, A. Yamashita and R. Machida, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1041 (1985).
- 47) K. Hiratani, K. Taguchi, K. Ohhashi and H. Nakayama, *Chem. Lett.*, 2073 (1989).
- 48) K. Hiratani and K. Taguchi, *Chem. Lett.*, 725 (1990)
- 49) E. M. Choy, D. F. Evans and E. L. Cussler, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7085 (1974).
- 50) W. C. Babcock, D. T. Friesen and E. D. Lachapelle, *J. Membr. Sci.*, **26**, 303 (1986).
- 51) W. C. Babcock, R.W. Baker, E.D. Lachapelle and K.L. Smith, *J. Membr. Sci.*, **7**, 89 (1980).
- 52) S. Takeshima, unpublished data
- 53) B. L. Mickel and A. Andrews, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5291 (1955).
- 54) S. Takeshima, unpublished data.
- 55) 竹島繁雄, 桜井 弘, 日本薬学会第 112 年会 講演要旨集 **4**, p 77 (1992).
- 56) S. M. Reberts ed. *Preparative Biotransformations: Whole cell and isolated enzymes in organic synthesis.* John Willey and Sons, Chichester 1992.
- 57) D.G.Rethwisch, A.Subramanian, G.Y.Yi, and J.S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**,1649 (1990).
- 58) H. V. Bergmeyer ed. *Methods of Enzymatic Analysis* 2nd ed. Vol. 4, p.1662, Verlag Chem, Weinheim 1974.
- 59) 疋田春夫, 石川治夫, ケミカル・エンジニアリング, **31**, 292 (1986)
- 60) J. P. Greenstein, *Methods in Enzymology*, **3**, 554 (1957).
- 61) J. Chibata, T. Tosa, T. Sato and T. Mori, *Methods in Enzymology*, **44**, 746 (1976).
- 62) 竹島繁雄, 広瀬善子, 桜井 弘, 日本薬学会第 111 年会講演要旨集 **4**, p. 80 (1991).
- 63) 寺本正明, 膜, **19**, 133 (1994)
- 64) K. Martinek, A. V. Levashov, Y.L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, and I.V. Berezin, *Science*, **218**, 889 (1982).
- 65) P. L. Luisi and B. S. Hofmann, *Methods in Enzymology*, **136**, 188 (1987).
- 66) P. L. Luisi, M. Giomini, M P. Pileni and B. H. Robinson, *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 209 (1988).

- 67) P. Luthi and P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7285(1984).
- 68) H. G. Jacobson and L. H. Smith, *Physiol. Rev.*, **48**, 424 (1968).
- 69) J. Frendo, K. Koj and J.M. Zgliczynski, *Nature*, **183**, 685 (1959).
- 70) C.E. Wright, H.H. Tallen and Y.Y. Lin, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 427 (1986).
- 71) R. W. Chesney, *Adv. Pediat.*, **32**, 1 (1985).
- 72) K. Kirk and J. Kirk, *FEBS Lett.*, 336,153 (1993).
- 73) S. Andrews and C.L.A. Schmidt, *J. Biol. Chem.*, **73**, 651 (1927).
- 74) H. Irving, R. J. P. Williams, D. J. Ferrett and A. E. Williams, *J. Chem. Soc.*, 3494 (1954).
- 75) H. Sakurai and S. Takeshima, *Sulfur Amino Acids*, **3**, 305 (1980).
- 76) H. Sakurai and S. Takeshima and K. Horisaka, *Sulfur Amino Acids*, **4**, 257 (1981).
- 77) 山口賢次, 化学と生物, **23**, 29 (1985).
- 78) J. A. Barnard, S. Thaxter, K. Kikuchi and F. K. Ghishan, *Am. J. Physiol.*, **254**, G33 (1988).
- 79) R.J. Turner, *J. Biol. Chem.*, **261**, 16060 (1986)
- 80) W. G. M. Hardison and R. Weinen, *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 145 (1980).
- 81) R. Rozen, H. S. Tenenhouse, and C. R. Scriver, *Biochem. J.*, **180**, 245 (1979).
- 82) J. H. Fendler and E. J. Fendler, *Catalysis in Micellar and Macromolecular System* p. 314 Academic Press, New York 1975.
- 83) 本木昌二, 岩知道正, 桐栄恭二, *ぶんせき*, 234 (1980).
- 84) 酒井忠雄, 本水昌二, *ぶんせき*, 61 (1989).

- 85) H. Kohara and H. Ishibashi, *Bunseki-kagaku*, **20**, 65(1971).
- 86) H. Uedaira and H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **37**, 1885 (1964).
- 87) S. Takeshima, H. Sakurai and K. Horisaka, *Sulfur Amino Acids*, **6**, 37 (1983).
- 88) S. Takeshima, H. Sakurai and K. Horisaka, *Sulfur Amino Acids*, **8**, 43 (1985).
- 89) C. W. Tabor and H. Tabor, *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 749 (1984).
- 90) 五十嵐一衛, *薬学雑誌*, **108**, 187 (1988).
- 91) 白幡晶, *化学と生物*, **28**, 162 (1990)
- 92) D. M. L. Morgan, *Biochem Soc. Trans.*, **18**, 1079 (1990).
- 93) R. D. Stocum, R. Kaur-Sawhney and A. W. Golstone, *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 283 (1984).
- 94) A. M. Liquiori, L. Costantino, V. Crescenzi, V. Elia, E. Giglio, R. Puliti, M. De Santi Savino and V. Vitagliano, *J. Mol. Biol.*, **24**, 113 (1967).
- 95) K. Igarashi, J. Sakamoto, N. Goto, K. Kashiwagi, R. Honma and S. Hirose, *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**, 438 (1982).
- 96) B. Tadolini, L. Cabrini, E. Varani and A. M. Sechi, *Biogenic Amines*, **3**, 87 (1985).
- 97) A. Toninello, F. Di Lisa, D. Siliprandi and N. Siligrandi, *Biochim. Biophys. Acta*, **815**, 399 (1985).
- 98) A. Toninello, F. Di Lisa, D. Siliprandi and N. Siligrandi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 363 (1986)
- 99) S. Yakeshima, unpublished data
- 100) E. Kimura, M. Kodama and T. Yatsunami, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3182 (1982).
- 101) C.W.Porter, J.M.Miller and R.J. Bergeron, *Cancer Res*, **44**, 126 (1984).

- 102) Y. Kakinuma, K. Hoshino and K. Igarashi, *Eur. J. Biochem.*, **176**, 409 (1988).
- 103) T.L. Byers and A.E. Pegg, *Am. J. Physiol.*, **247**, C545 (1989).
- 104) J. Ruzicka, H. Hansen and J. CHR Tjell, *Anal. Chim. Acta*, **67**, 155 (1973).
- 105) C. Newton, W. Pangborn, S. Nir and D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **506**, 281 (1978).
- 106) T. Yamashita, Y. Horio, M. Yamada, N. Takahashi, C. Kondo and Y. Kurachi, *J. Physiol.*, **493**, 143 (1996).
- 107) M. Moruzzi, B. Barbiroli, M.G. Monti, B. Tadolini, G. Hakim and G. Mezzetti, *Biochem. J.*, **247**, 175 (1987).
- 108) C. V. Nicchitta and J. R. Williamson, *J. Biol. Chem.*, **259**, 12978 (1984).
- 109) I. Russtenbeck, G. Eggers, W. Muster and S. Lenzen, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **194**, 1261 (1993).
- 110) D.A. Brown, T. Malkin and G.K. Maliphant, *J. Chem. Soc.* 1584 (1955)

謝 辞

本研究に際し終始ご指導下さいました京都薬科大学 広瀬信吾名誉教授並びに櫻井弘教授に心より感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、種々御指導下さいました富山医科薬科大学薬学部竹口紀晃教授、堀越勇教授、谷村颯徳教授、上野雅晴教授、並びに京都薬科大学 井上武久助教授に感謝致します。

また、実験に際し、貴重な試料の提供を頂きました、神戸薬科大学 堀坂和敬教授に深く感謝いたします。

さらに、本研究の実験に御協力頂きました京都薬科大学 薬品分析学教室 I の皆様にお礼を申し上げます。

最後に、本論文作成に際し、多大なる御指導と御支援、激励をいただきました京都薬科大学 大幡勝也学長に深謝致します。

