

Cholesterol, L- α -Phosphatidylinositol, L- α -Phosphatidylserine 을 함유한 L- α -Dimyristoyl-phosphatidyl Choline 리포솜 에 대한 Phospholipase D의 作用에 관한 研究

李 殷 玉

淑明女子大學校 藥學大學

(Received July 13, 1983)

Eun Ock Lee

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140, Korea

Effect of Phospholipase D on the L- α -Dimyristoyl-phosphatidyl Choline Liposome Containing Cholesterol, L- α -Phosphatidylinositol and L- α -Phosphatidylserine

Abstract—When the reaction rate constant k of phospholipase D on liposome was measured by the ANS fluorometry, k of phospholipase D on DMPC liposome which was made of L- α -PI, cholesterol and L- α -PS decreased than that of phospholipase D on DMPC liposome with cholesterol or with PI and cholesterol. Optimal Ca^{2+} concentration, the most important factor on effect of phospholipase D, also decreased to 1mM, as compared with 10mM and 60mM respectively when cholesterol and PI were added, and cholesterol only was added. The change of cholesterol Mol% had a great influence on k value of phospholipase D. But in case of addition of L- α -PS to cholesterol, the influence was relatively diminished.

生體膜에 存在하는 酵素들이 生命의 維持에 重要な 役割을 하고 있는 것은 잘 알려진 事實이다. 生體膜을 構成하고 있는 磷脂質에 作用하는 酵素는 磷脂質의 狀態에 따라서 그 活性이 顯著하게 差異가 있는데 非ion性 界面活性劑에 依하여 lecithin分子相互間의 凝集을 妨害하므로써 酵素가 Micelle 表面에 吸着이 容易하며 活性化 自由 energy와 entropy를 增加시킴으로 反應性이 높은 狀態에 lecithin을 維持하기 때문에 酵素에게 反應이 잘 된다는 事實을 보아도 明白하다.¹⁻⁴⁾ 이와같은 生體膜에서의 酵素反應의 機轉을 알아보기 위하여 L- α -dimyristoyl-phosphatidyl choline (L- α -DMPC)을 가지고 超音波를 照射하여 調製한 liposome에 對하여 phospholipase D를 作用시켜 그 反應經路를 ANS螢光法으로 追跡하여 酵素反應에서 가장 重要的 因子의 하나인 最適 Ca^{2+} 濃도에 對하여⁵⁻⁸⁾ 새로운 知見을 얻어서 그 結果를 報告하고자 한다. 生體膜의 安定化와 相轉位 溫度에 關하여 二重效果等⁹⁻¹⁴⁾ 重要的 生理作用을 하고 있는 cholesterol을 添加하여 安定한 liposome을 製造하고 phospholipase D의 作用에 對한 cholesterol의 效果를 調査·報告하였으며¹⁵⁾ 또한 酸性磷脂質의 一種이며 生體膜에서 일어나는 各種 生理現象과 酵素反應에 重要的 役割을 하는 L- α -phosphatidyl inositol (L- α -PI)¹⁶⁾을 다시 添加하여 liposome을 製造하고 phospholipase D의 作用에 對한 L- α -PI와 cholesterol의 效果를 報告한 바 있다.¹⁷⁾ 本研究에서는 生體膜의 相分離狀態나 生體膜內部에 負의 荷重을 갖는데 重要的 役割을 하고, 또 最近의 研究報文에 依하면 生體膜中에서 새로운 hormone受容機構에 있어서 C-kinase의 活性化反應에 가장 有效한 L- α -phosphatidyl serine (L- α -PS)¹⁶⁾을 다시 添加하여 liposome을 製造하고 phospholipase D의 酵素反應을 調査한 바 酵素反應의 反應速度定數 k 가 減少하는 傾向이 있으며 酵素反應에서 가장 重

要한 因子의 하나인 最適 Ca^{2+} 濃도가 1/60로 減少하는 結果를 얻어 報告하고자 한다.

實 驗 方 法

機器 및 試藥—本 實驗에서의 超音波는 Ultrasonic Disruptok Model UR-200P로 60MHz 強度 7에서 照射하였으며 螢光度測定은 Jasco Fp 550 spectrofluorometer로 勵起光 360nm 螢光 480nm 에서 測定하였다. L- α -dimyristoyl-phosphatidyl choline (L- α -DMPC), L- α -phosphatidyl inosital (L- α -PI) 98% sodium salt, L- α -phosphatidyl serine (L- α -PS) Approx 98% mono-sodium salt (from bovine brain)는 Sigma사의 것을, 8-anilino-1-naphalene sulfonic acid ammonium salt (ANS) 和光純藥(東京)의 것을 사용했다. Cholesterol은 特級를 methanol로 再結晶하여 사용했고 phospholipase D (from cabbage, 比活性約 0.3U/mg)는 Belinga Biochemicals(西獨)의 것을 사용하였으며 기타 試藥은 特級을, 물은 再蒸溜水를 使用하였다.

Liposome의 製造—1~2日 眞空乾燥하여 完全히 脫水한 L- α -DMPC, cholesterol, L- α -PI, L- α -PS 一定量을 chloroform으로 溶解시킨後 有機溶媒를 1~2日 眞空下에서 完全히 除去한 다음 Tris-Hep's buffer溶液(pH 5.6)을 加하고 氷冷下 超音波를 1分間 照射 2分間冷却을 反復하면서 20分間 照射하여 透明한 liposome을 製造하였다.¹⁸⁾

Phospholipase D의 力價 檢定—比活性 約 0.3U/mg로 明記되어 있으나 正確한 力價檢定를 定하기 위하여 cholesterol 30Mol%를 含有한 L- α -DMPC liposome을 製造하고 pH 5.6 24°C 60mM Ca^{2+} 條件下에서 phospholipase D를 作用시킨 時의 反應速度定數 k 를 標準으로하여 $k \pm 5\%$ 의 力價를 가진 Lot No 一定한 phospholipase D를 Tris-Hep's buffer 溶液 1ml當 1mg의 濃度로 調製 氷冷下에서 使用하였다.

螢光度 測定—Liposome 一定量에 2.0×10^{-5} Mol ANS 螢光色素를 含有하는 同量의 Tris-Hep's buffer 溶液을 加하고 一定溫度에 30分間 放置한 後 3ml를 取하고 0.5ml의 phospholipase D의 Tris-Hep's buffer 溶液을 加하는 同時에 反應溶液의 螢光強度의 減少를 經時的으로 測定하였다.

反應 速度 定數 k 의 決定—이 方法의 原理는 L- α -DMPC liposome에 ANS螢光色素가 Langmuir 等溫吸着式型으로 化學吸着되어 螢光을 나타내고

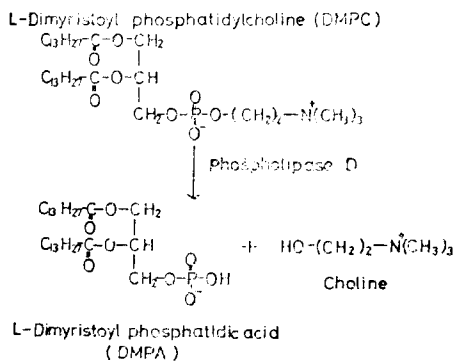


Fig. 1—Degradation procedure of L- α -dimyristoyl phosphatidylcholine by phospholipase D into L-dimyristoyl phosphatidic acid and choline.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m \cdot k} \cdot \frac{1}{p} + \frac{1}{v_m}$$

v ...ANS 吸着量
 v_m ...ANS 飽和吸着量
 k ...比例定數

여기에 phospholipase D를 作用시키면 L- α -DMPC가 choline과 L- α -dimyristoyl phosphatidic acid (L- α -DMPA)로 分解되기 때문에 ANS螢光色素가 溶液中에 放出되면서 螢光이 消失되는데 있다(Fig. 1). ANS螢光色素가 燐脂質에 吸着되면 分子內回轉이 制限되어 輻射에 依한 energy遷移가 작아지기 때문에 螢光의 強度가 커지지만 反對로 溶液中에 放出된 ANS螢光色素는 分子內回轉이 容易하기 때문에 螢光의 強度가 顯著하게 減少되는 것이다.¹⁹⁾ 螢

光도와 時間典線이 一次反應으로 直線이 될때까지 外差法으로 $F(\infty)$ 를 決定하고 그 直線의 slope로 부터 反應速度定數 k 를 決定하였다.

$$k = \frac{\ln(F_1 - F_\infty) - \ln(F_2 - F_\infty)}{t_1 - t_2}$$

其他 詳細한 것은 前報의^{15,17)} 同一하다.

實 驗 結 果

Phospholipase D와 反應速度定數 k —L- α -DMPC 8 $\times 10^{-4}$ Mol, L- α -PI 5%, L- α -PS 7%와 cholesterol 10Mol%, 13Mol%, 18Mol%의 各各의 組成比率로 混合 liposome를 製造하고 Ca²⁺濃도를 1mM Ca²⁺, 5mM Ca²⁺, 10mM Ca²⁺에서 各溫度에 따라 phospholipase D (E_0 0.143mg/ml)를 作用시켜 螢光度를 測定하였다. 그中에서 20°C cholesterol 13Mol% 1mM Ca²⁺일 때의 螢光度測定値와 그外 4種의 다른 條件下의 경우의 螢光度測定値를 經時的으로 圖示하면 Fig. 2와 같다.

Fig. 2의 graph를 直線化 하기 위하여 無限大의 時間이 經過하였을 때의 螢光度 $F(\infty)$ 를 減한 螢光度의 自然對數를 經時的으로 圖示하면 Fig. 3과 같다.

Fig. 3의 直線의 slope로부터 phospholipase D를 作用시켰을 때의 反應速度定數 k 를 計算하였다. 各記 다른 條件으로 製造한 liposome에 phospholipase D를 作用시켰을 때의 各各의 反應速度定數 k 값은 Table I과 같다.

最適 Ca²⁺濃도와 反應速度定數 k —liposome에 phospholipase D를 作用시켰을 때의 反應速度定數 k 는 Ca²⁺濃도에 따라 많이 左右되는데²⁰⁻²⁸⁾ cholesterol만을 添加하면 60mM Ca²⁺에서 k 는 $5.04 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$, 同一條件下에 40mM Ca²⁺ $1.27 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 로서 約 1/4로 k 가 減少된다. 또한 그 이

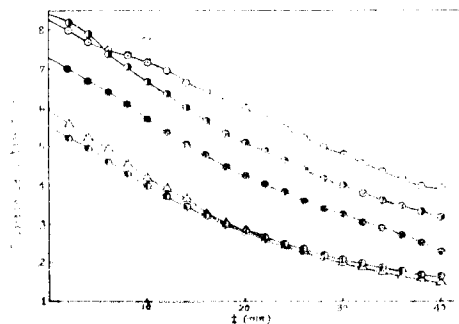


Fig. 2—ANS fluorescence intensity in reaction of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D, E_0 0.143mg/ml, DMPC 8 $\times 10^{-4}$ Mol%, Heps buffer pH 5.6, PI 5%, PS 7%, 20°C.

- Cholesterol 18Mol% 10mM Ca²⁺
- Cholesterol 13Mol% 1mM Ca²⁺
- △--- Cholesterol 18Mol% 5mM Ca²⁺
- ◐--- Cholesterol 18Mol% 1mM Ca²⁺
- ◑--- Cholesterol 10Mol% 1mM Ca²⁺

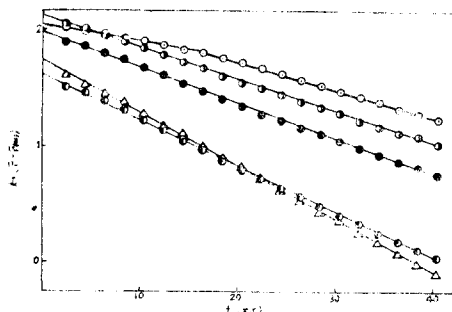


Fig. 3—Logarithm ANS fluorescence intensity ($\ln(F - F(\infty))$) in reaction of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D, E_0 0.143mg/ml, DMPC 8 $\times 10^{-4}$ Mol%, Heps buffer pH 5.6, PI 5%, PS 7%, 20°C.

- Cholesterol 18Mol% 10mM Ca²⁺
- Cholesterol 13Mol% 1mM Ca²⁺
- △--- Cholesterol 18Mol% 5mM Ca²⁺
- ◐--- Cholesterol 18Mol% 1mM Ca²⁺
- ◑--- Cholesterol 10Mol% 1mM Ca²⁺

Table I—Reaction constant rate k of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D, E_0 0.143mg/ml, DMPC 8×10^{-4} Mol%, Heps buffer pH 5.6, PI 5%, PS 7%.

Temp(°C)	$F(\infty)$	$k \times 10^4$	1mM Ca^{2+}	Temp(°C)	$F(\infty)$	$k \times 10^4$	CH18Mol%
15	0.58	16.42	CH18Mol%	15	0.41	4.46	10mM Ca^{2+}
18	0.60	7.29		18	0.42	3.89	
20	0.60	6.51		20	0.41	3.85	
22	0.60	6.39		22	0.40	2.27	
24	0.60	6.11		24	0.40	2.04	
26	0.61	6.20		26	0.40	2.04	
15	0.41	6.75	CH13Mol%	15	0.60	6.55	5mM Ca^{2+}
18	0.40	10.56		18	0.61	6.63	
20	0.40	5.04		20	0.57	7.50	
22	0.41	5.00		22	0.60	6.72	
24	0.41	4.72		24	0.60	5.36	
26	0.40	4.39		26	0.60	5.31	
15	0.42	4.48	CH10Mol%				
18	0.40	9.43					
20	0.40	4.67					
22	0.42	3.81					
24	0.40	3.62					
26	0.42	3.64					

L- α -DMPC : L- α -Dimyristoyl Phosphatidylcholine

L- α -PI : L- α -Phosphatidylinositol

L- α -PS : L- α -Phosphatidylserine

CH : Cholesterol

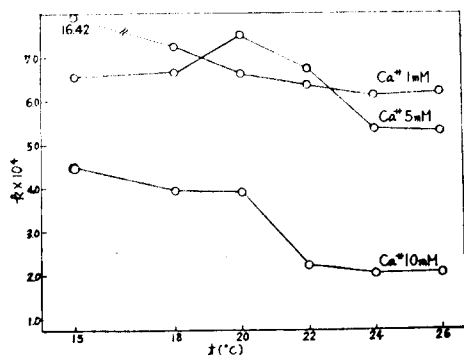


Fig. 4—Reaction rate constant k of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D, E_0 0.143mg/ml, DMPC 8×10^{-4} Mol%, Heps buffer pH 5.6, Cholesterol 18Mol%, PI 5%, PS 7%.

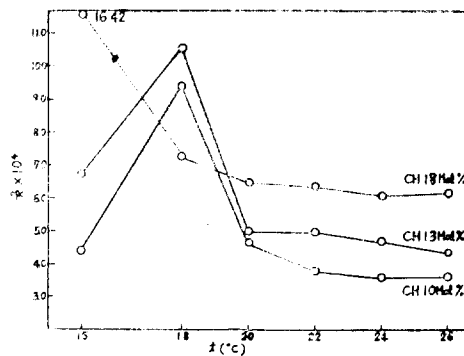


Fig. 5—Reaction rate constant k of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D, E_0 0.143mg/ml, DMPC 8×10^{-4} Mol%, Heps buffer pH 5.6, Ca^{2+} 1mM, PI 5%, PS 7%.

下の Ca^{2+} 濃度에서는 測定이 거의 不可能할 程度이다.

cholesterol와 L- α -PI를 添加하여 L- α -DMPC-liposome를 만들어 phospholipase D를 作用시킬 때의 反應速度定數 k 는 最適 Ca^{2+} 濃度 10mM에서 가장 크다. 또한 cholesterol, L- α -PI, L- α -PS를 添加하면 Fig. 4에서 보는 바와 같이 1mM Ca^{2+} 가 最適인 것을 알 수 있다.

Cholesterol Mol%와 反應速度定數 k —liposome에 含有된 cholesterol이 phospholipase D의 作用을 促進하는데 同一條件下에서 cholesterol의 添加量이 增加하면 23Mol%에서 k 는 $1.27 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 이고 26Mol%에서 k 는 $5.04 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 로 約 4배로 된다. 反面에 다시 L- α -PI와 L- α -PS를 添加하여 L- α -DMPC-liposome를 製造하여 phospholipase D를 作用시켜 反應速度定數 k 를 測定하면 cholesterol 10Mol%에서 k 는 $0.47 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 이고 18Mol%에서 k 는 $0.65 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 로 約 1.4배가 된다. 即 cholesterol의 Mol% 變化에 따른 k 의 變化率은 L- α -PS를 添加하면 작아지는 것을 알 수 있다.

考 察

X-ray 結晶格子研究에 依하면 cholesterol의 分子의 크기는 核部分 10.5Å 側鎖部分 6.5Å로서 磷脂質이 脂肪酸側鎖의 크기(極性部分 10Å 非極性部分 20Å)와 類似하므로 生體膜에서 잘 混合되어 진다고 한다.¹³⁾ 또한 cholesterol의 水酸基가 磷脂質의 carbonyl基와 近接되어 있다는 事實은²⁹⁻³⁰⁾ 磷脂質의 極性頭部에서부터 cholesterol分子는 約 10Å程度 生體膜의 内部에 사입되어 存在한다는 證據를 提示하고 있다.³¹⁻³²⁾ 以上과 같은 事實로 보아도 cholesterol은 磷脂質로 만든 liposome의 安定性에 至大한 影響을 주고 있음을 알 수 있다.³³⁻³⁸⁾ 即 L- α -DMPC-liposome를 製造할 때 cholesterol을 添加하므로 대단히 安定한 直徑 約 250Å의 liposome을 製造할 수 있는 것이다.¹⁸⁾ 反面에 cholesterol을 含有한 L- α -DMPC-liposome에 對한 phospholipase D의 作用은 cholesterol을 含有하지 않은 L- α -DMPC-liposome에 對한 것에 比하면 대단히 增加하고 있는 實驗結果를 얻었다. 勿論 L- α -DMPC로 만든 Miceller에 phospholipase D를 作用시킬 때의 反應速度定數 k 보다는 작다. 이와같이 cholesterol이 phospholipase D의 作用을 促進한다는 事實은 liposome을 安定화한다는 現象과 反對되는 새로운 實驗結果이다. 따라서 그 原因은 아직은 不明이지만 앞으로 究明되어야 할 問題라고 思慮되며 ACTH刺激의 結果 生體膜의 酵素活性의 促進이 cholesterol과 關係있다는 報文¹³⁾과 一脈相通하는 點도 있다. cholesterol에 依한 酵素 phospholipase D의 反應促進效果는 cholesterol의 添加量이 增加하면 正比例하여 커지지만 어느 點을 境界로하여 減少하는 傾向이 있다.¹⁵⁾ (Fig. 6)

그러나 Table II에서 보는 바와 같이 L- α -PS를 添加하면 phospholipase D를 作用시킬 때 反應速度定數 k 는 減少하는 傾向이 있다.

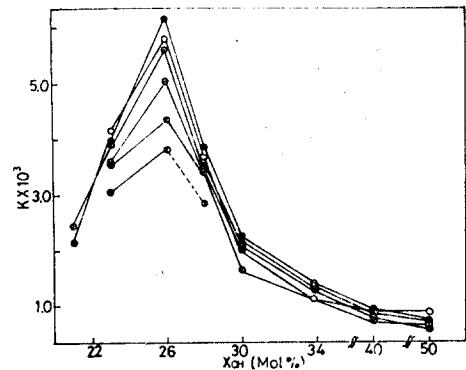


Fig. 6—Reaction rate constant k of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D E_0 0.143mg/ml, DMPC 8×10^{-4} Mol%, Heps buffer pH 5.6, Ca^{2+} 60mM.

○ 26°C ● 24°C ◻ 22°C ◊ 20°C
△ 18°C ● 16°C ● 15°C

Table II--Reaction constant rate k of phospholipase D and liposome under the condition of phospholipase D, E_0 0.143mg/ml, DMPC 8×10^{-4} Mol%, Heps buffer pH 5.6, 20°C .

Concentration of cholesterol (Mol%)	L- α -phosphatidyl-inositol (%)	L- α -phosphatidyl-serine (%)	Concentration of Ca^{2+} (mM)	Reaction rate of constant $\times 10^{-3}\text{sec}^{-1}$
26			60	5.04
26			40	1.27
23			60	3.61
18	5		10	6.60
26	5		10	3.19
18	5	7	1	0.65
10	5	7	1	0.47
18	5	7	10	0.39

또한 phospholipase D을 작용시킬 때 cholesterol의 Mol%변화에 따른 k 의 변화율은 Fig. 5, Fig. 6를 비교하여 보아도 명확히 알 수 있듯이 L- α -PS를添加함으로써比較的 작아짐을 알 수 있다.

生體膜에 Hormone이 작용할 때 Ca^{2+} 이 必須不可缺인 事實로 미루어보아 特히 特異성이 銳敏한 Ca^{2+} 를 情報傳達物質로 하는 作用機轉을 推測할 수 있는데³⁹⁻⁴⁵ 生體膜에서의 phospholipase 酵素들의 活性化는 細胞內的 Ca^{2+} 濃도에 依해서만 調節된다는 最近의 報告가 있다.⁴⁶⁻⁴⁸ calmodulin에 依한 酵素活性化의 機構는 Ca^{2+} 과 酵素活性化의 相互密接한 關係性を 暗示하는 重要한 事實이다.^{40,49-51} 이와같은 事實로 바루어 推測컨데 phospholipase D의 最適 Ca^{2+} 濃도가 L- α -PI를 添加함으로써 60mM에서 10mM 1/6로 減少되었으¹⁷ 再次 L- α -PS를 添加하므로써 最適 Ca^{2+} 濃도가 1mM 1/60로 減少되었다는 새로운 實驗結果는 어느 時定 磷脂質이 生體膜중에 存在하므로써 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Mol의 生理的인 Ca^{2+} 濃度에서 酵素를 活性化하여 生命現象을 維持한다는 假定이 可能하다. 따라서 酵素의 最適 Ca^{2+} 濃도를 1/60로 減少한다는 結果는 生命現象의 根本原因을 究明할 수 있는 하나의 새로운 指標가 될 것으로 思慮된다.

結 論

1. L- α -DMPC liposome에 cholesterol, cholesterol와 L- α -PI를 添加하여 製造하였을 때보다 L- α -PS, L- α -PI, cholesterol를 添加하여 L- α -DMPC liposome를 製造하였을 때의 phospholipase D에 對한 作用을 實驗한 結果 反應速度定數 k 가 減少하는 傾向이 있다.

2. L- α -PS를 添加하므로써 phospholipase D의 最適 Ca^{2+} 濃도가 1mM로서 1/10~1/60倍로 減少하는 傾向이 있다.

3. L- α -PS를 添加하므로써 Ca^{2+} 濃度の 變化에 따른 phospholipase D의 反應速度定數 k 의 變化율은 比較的 적어지는 傾向이 있다.

4. L- α -DMPC liposome에 cholesterol을 添加하므로써 나타난 mol%변화에 따른 phospholipase D의 反應速度定數 k 의 變化율은 L- α -PS를 添加하므로써 比較的 작아지는 傾向이 있다.

本 研究을 指導하여 주신 京都大學 藥學部 中垣正幸 教授와 恩師 洪文和 教授에 深心한 感謝를 드리며 本 研究은 1982學年度 문교부 학술연구조성비로 이루어진 것이며 衷心으로 감사의 뜻을 표한다.

文 獻

1. 加藤伊津美, 中垣正幸 日本化學會 第42回 秋季年會發表 仙台市 (1980).
2. 加藤伊津美, 中垣正幸 日本化學會 Colloidおよび界面化學部會 第33回 討論會にて發表 札幌市 (1980).
3. C.R. Kensil and E.A. Dennis, Action of cobra venom phospholipase A₂ on the gel and liquid crystalline states of dimyristoyl and dipalmitoyl phosphatidyl choline vesicles. *J. Biol. Chem.* **254**, 5843 (1979).
4. R. Kannagi and K. Koizumi, Effect of different physical states of phospholipid substrates on partially purified platelet phospholipase A₂ activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **556**, 423 (1979).
5. W.A. Pieterse, J.J. Volwerk and G.H. De Haas, Interaction of phospholipase A₂ and its zymogen with divalent metal ions. *Biochemistry* **13**, 1439 (1974).
6. H.M. Verheij, J.J. Volwerk, B.W. Dijkstra, W.C. Puyk, G.H. De Haas, Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **19**, 743~750 (1980).
7. A.S. Atwal, N.A.M. Eskin and H.M. Henderson, Isolation and characterization of phospholipase D from Faba beans. *Lipids* **16**, 913 (1979).
8. Y. Takai, A. Kishimoto, U. Nikkawa, T. Mori and Y. Nishizuka, Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid dependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1217 (1979).
9. E.S. Wu, K. Jacobson and D. Papahadjopoulos, Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **16**, 3936 (1977).
10. J.R. Rubenstein, B.A. Smith, and H.M. McConnell. Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 15 (1979).
11. A. Sakanishi, S. Mitaku and A. Ikegami, Stabilizing effect of cholesterol on phosphatidylcholine vesicles observed by ultrasonic velocity measurement. *Biochemistry* **18**, 2636 (1979).
12. E. Oldfield, M. Meadows, D. Rice, and R. Jacobs, Spectroscopic studies of specifically deuterium labeled membrane systems. Nuclear magnetic resonance investigation of the effects of cholesterol in model systems. *Biochemistry* **17**, 2727 (1978).
13. 木村徳次, Cholesterolと生體膜 6, 2 (1981).
14. 齊藤肇, ²H-NMRによる生體膜の構造研究. 生化學 **52**, 172 (1980).
15. 李殷玉, 加藤伊津美, 中垣正幸, Action of phospholipase D on the DMPC/Cholesterol liposome 日本藥學會 第101例會發表(熊本市) (1981). 日本藥學雜誌投稿中.
16. 西塚泰美, 新しい Hormone受容機構における磷脂質の役割と生體過程の調節. 生體機能 第1回 symposium (京都) (1980).
17. 李殷玉, 中垣正幸 Action of phospholipase D on the lecithin liposome with contains L- α -PI. 日本膜學會 第3年會發表(東京) (1981). 日本膜學會誌投稿中.
18. G.W. Stockton, C.F. polnaszek, A.P. Tulloch, F. Hasan and C.P. Smith, Molecular motion and order in single-bilayer vesicles and multilamellar dispersions of egg lecithin and lecithin-cholesterol mixtures. A deuterium nuclear magnetic resonance study of specifically labeled lipids. *Biochemistry* **15**, 954 (1976).
19. 葛西道生: 螢光 spectrum(特に生體膜への應用) *Biophysical Chemistry*(上) 化學增刊 71 41~51 (1977).
20. F.M. Davidson and C. Long. The structure of the naturally occurring phosphoglycerides. 4. Action of cabbage-leaf phospholipase D on ovolcithin and related substance. *Biochem. J.* **69**, 458 (1958).
21. R.H. Quarles and M.C. Dawson, The hydrolysis of monolayers of phosphatidyl [Me-¹⁴C] choline by phospholipase D. *Biochem. J.* **113**, 697 (1969).
22. T.T. Allgyer and M.A. Wells, Phospholipase D from soyab cabbage: purification and preliminary kinetic characterization. *Biochemistry* **18**, 5348 (1979).
23. T.J. Beeler, I. Jona and A. Martonosi. The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J. Biol. Chem.* **254**, 6229 (1979).
24. T. Taki and J.N. Kanfer, Partial purification and properties of a rat brain phospholipase D. *J. Biol.*

- Chem.* 254, 9761 (1979).
25. R. Franson and M. Waite, Relation between calcium requirement, substrate charge and rabbit polymorphonuclear leukocyte phospholipase Az activity. *Biochemistry* 17, 4029 (1978).
 26. G.H. De Haas. P.P.M. Bensen, W.A. Pieterse and L.L.M. Van Deenen. Studies on phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas. III. Action of the enzyme on short-chain lecithins. *Biochim. Biophys. Acta.* 239, 252 (1971).
 27. A. Kishimoto, Y. Takai, T. Mori, U. Kikkawa and Y. Nishizuka, Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255, 2273 (1980).
 28. Y. Takai, A. Kishimoto, Y. Iwasa, Y. Kawahara, T. Mori and Y. Nishizuka. Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* 254, 3692 (1979).
 29. N.P. Franks, Structural Analysis of Hydrated Egg Lecithin and Cholesterol Bilayers. I. X-ray Diffraction. *J. Mol. Biol.* 100, 345 (1976).
 30. D.L. Worcester and N.P. Franks. Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol Bilayers. II. Neutron Diffraction. *J. Mol. Biol.* 100, 359 (1976).
 31. J.C.W. Shepherd and G. Büldt, The influence of cholesterol on head group mobility in phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 558, 41 (1979).
 32. B. De Kruijff, P.R. Cullis and G.K. Radda, Outside-inside distribution and size of mixed phosphatidylcholine cholesterol vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 436, 729 (1976).
 33. B. Snyder and E. Freire, Compositional domain structure in phosphatidylcholine-cholesterol and sphingomyelin-cholesterol bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 4055 (1980).
 34. R. Narayanan. R. Paul and P. Balaram, Fluorescent probe studies of mixed micelles of phospholipids and bile salts. Effect of cholesterol incorporation. *Biochim. Biophys. Acta.* 597, 70 (1980).
 35. P.R. Cullis, and B. De Kruijff, Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 559, 399 (1979).
 36. 井上圭三, 生體膜實驗法(下) リポソーム實驗法と應用. 別冊蛋白質, 核酸, 酵素, 185~198 (1974).
 37. 井上圭三, 奥直人. 野島庄七, 生體膜研究法 人工膜によるモデル實驗(liposomeを用いて) 代謝 18, 81 (1981).
 38. 齋藤肇, 生體膜研究法 NMR による生體膜の構造研究 代謝 18 179 (1981).
 39. 淺野朗, 細胞内情報系としての Ca^{++} symposium 大阪(1980).
 40. Baker. P.F, in Calcium in biological systems: symposia of the society for experimental biology No 30. Cambridge Univ. press p.67 (1976).
 41. 垣内史朗, 高井義美: 特集 Ca^{++} と細胞機能 代謝 17, No. 8 1 (1980).
 42. 額糺教三, Ca^{++} II 特集 代謝 12, No.11 3 (1975).
 43. 岸本明, Ca^{++} と Hormone作用 代謝増刊 2號 363 (1973).
 44. 岸本明, Hormone, の作用と細胞膜リン脂質 代謝 化學増刊 83, 119 (1980).
 45. 高井義美, Ca^{++} channel 代謝 16, No. 4 23~31 (1979).
 46. 尾形悦郎, 無機 ion による調節 蛋白質酵素核酸 臨時増刊 22, 1764 (1977).
 47. 市川厚・富田謙吉, マスト細胞における情報の認識と應答の調節 化學増刊 93, 33 (1981).
 48. 御橋廣貞, 特集 筋肉の收縮弛緩の Ca^{++} による制御の分子機構 生體物理 19, 123 (1979).
 49. 笠井久隆, Calcium ion結合蛋白質, 蛋白質, 核酸, 酵素, 臨時増刊 22, 680 (1977).
 50. 八木康一, Ca^{++} Calmodulin: 化學 35, 1015 (1980).
 51. 李殷玉, 生體膜における phosphatidyl-inositol の代謝 回轉について. 京大コロキウム(京都) (1981).