

蛍光色素遊出法を応用した細菌脂質膜安定性の研究

岡山大学医学部細菌学教室 (主任: 金政泰弘教授)

長 町 榮 子

(昭和62年11月26日受稿)

Key words: liposome, anti-osmotic stability, release of carboxyfluorescein, bacterial membrane lipids, bacterial L-form

緒 言

単細胞である細菌は個々の細胞が直接外界に接しているため、環境の影響を全表面に受けることは周知の事実である。その表層を構成する主要なもの一つとして細胞膜があり、ホメオスタシスにはかけがえのない主役を演じている^{1)~4)}。しかもその外側には細胞壁が存在し、機械的防御と形態保持に貢献している。したがって細胞壁を失いL型化したような細菌では、細胞膜のみで細胞機能の維持を計らなくてはならない⁵⁾。さらに、元々細胞壁を有しないマイコプラズマでは、より高度な細胞機能維持能力を有していることが考えられる。

細菌細胞膜は、外界の変化や形態変化に対応して特殊な適応変化により膜の安定性を計っている事実を、金政らは化学的な分析により把握している^{6)~10)}。特に壁を失った時の外部環境に対する膜の安定性については、細胞内圧が極めて高いことから考えて、とりわけ低浸透圧に対する安定性が重要であると言える。

膜の安定性の物性解析法には、示差走査熱量測定 (DSC)、電子スピン共鳴 (ESR)、核磁気共鳴 (NMR)などいろいろな機器を使用する方法があるが^{11)~19)}、これらの方法では対浸透圧の観点からの安定性をうかがうことは充分にはできない。そこでそのための最も合理的な方法を開発するために、カルボキシフルオレッセインを用いたいわゆる蛍光色素遊出法を導入して^{20)~24)}、細菌の膜脂質そのもので作製したリポソームの対浸透圧安定性測定法を確立した。そ

の結果、L型菌の膜脂質によるリポソームは親株のそれに比して極めて安定性が高く、マイコプラズマは更に高いことを知った。その安定性に貢献する成分としては、L型菌においてはカルジオリビンの增量、マイコプラズマにおいては総脂質中約30%を占めるコレステロールであることも明らかとなった。

材料および方法

I. 供試菌と培養方法

菌は、*Staphylococcus aureus* 209P (親株と略す)、それより誘導分離された安定L型菌 (L型菌と略す)²⁵⁾、および *Mycoplasma orale* CH-19299 (*M. orale*と略す) (東京大学農学部尾形学教授より分与を受けた) を供試した。

S. aureus 209P の基礎培地は、Brain heart infusion broth (BHI brothと略す) (Difco Laboratory, Detroit, Mich.) を用いた。親株の大量培養は BHI broth を用いて行い、L型菌は浸透圧調節剤として 5% NaCl を添加した BHI broth を用いた。大量培養は、親株およびL型菌ともに 3 回の前培養の後、1/100 量接種でモノ一振とう培養法により、微弱振とうしながら 37°C で行った。後期対数増殖期に達したとき (親株 8 時間、L型菌 48 時間) 12,000 × g、20 分間の遠沈集菌を行い、冷食塩水 (培養時と同一食塩濃度) で 3 回洗浄して以下の実験に供した。

M. orale の培養は、Chanock and Hayflick の培地²⁶⁾に自家調製した新鮮馬血清を 15% 加えた液体培地を用い、37°C で 2 日間静置培養した。菌は 12,000 × g、20 分間遠沈して回収したのち、

生理的食塩水で3回遠沈洗浄を行って以下の実験に供した。

II. 脂質の抽出および精製

脂質は、親株、L型菌および*M. orale*から抽出・精製し供試した。総脂質は、供試菌体の約20培養量のクロロホルム/メタノール(2/1, v/v)で抽出を3回行った後、Folch静置法にて純化、精製して得た²⁷。リン脂質は、総脂質をUnisil(100~200mesh, Clarkson Chemical Co., Inc., Williamsport, Pa.)を用いたケイ酸カラムクロマトグラフィー(1×20cm)にて分画し、メタノール画分を分取して用いた²⁸。またphosphatidyl-glycerol (PGと略す)およびcardiolipin (CLと略す)は、リン脂質画分をKieselgel 60G (Merck, Darmstadt)を用いてクロロホルム/メタノール/水(65/25/4, v/v/v)による一次元薄層クロマトグラフィーを行って分画した。その各スポットをかきとったものを、クロロホルム/メタノール/水(1/2/0.8, v/v/v)を用いるBligh-Dyer法²⁹にて抽出して供試した。

III. リポソームの作製

リポソームに封入するマーカー物質としては、水溶性の蛍光色素であるカルボキシフルオレッセイン(5,6-carboxyfluorescein, CFと略す)

(Eastman Kodak, Rochester, N. Y.)を、Ralstonらの方法³⁰により精製したものを用いた。

リポソームの調製は、総量1mgの脂質を試験管内壁にフィルム状に付着させ、自己消光濃度である0.2M CF水溶液の500μlを加えて推定相転移温度以上の70~75°Cに保ち、ポルテックスミキサーにて振とう混和した。

リポソーム形成後取り込まれなかったCFの除去は、Sepharose 4Bカラム(0.5×20cm, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala)を用い、0.18M NaCl加0.02M phosphate buffer(pH 7.6)にて溶出するゲルろ過法によった²⁴。

IV. ストップトフロー装置によるリポソーム変化の追跡

*S. aureus*の親株、そのL型菌および*M. orale*の総脂質を用いて、前述IIIの方法で0.2M NaClまたは0.2MCFをトラップしたリポソームを作製し、ストップトフロースペクトロフォトメーター・ユニオン RA-401 & RA-450(ユニオン、

Osaka)にて測定を行った³¹。リポソームを低浸透圧溶液中に投入した場合の体積変化の追跡は、0.2M NaClをトラップさせたりポソーム懸濁液と等量の水の混釀系で、450nmの90°光散乱測定により行った。同様に蛍光色素遊出の追跡は、0.2MCFをトラップさせたりポソーム懸濁液と等量の水の混釀系で、励起光490nm、蛍光520nmの測定によった。

V. 蛍光色素遊出法

リポソームを低浸透圧緩衝液に投入しバーストした際、リポソーム外へ遊出するCF量を分光蛍光光度計・日立560-10S(日立製作所、Tokyo)により、励起光を490nmとし、520nmにて蛍光測定を行った²²。すなわち、分光蛍光光度計に電子恒温循環装置(小松エレクトロニクス、Tokyo)を連結してセルホルダーを20°Cに保ち、セルに990μlの低浸透圧緩衝液を入れておき、これに10μlのリポソーム懸濁液を投入後、直ちに混和して蛍光測定に供した。測定は投入後継続的に行い、遊出蛍光量は2~10分の間のプロト一値を持ってあてた。測定後、全CFトラップ量を求めるため、10% TritonX-100を10μl添加し蛍光量を測定した。そしてその全CFトラップ量に対するCF遊出量を%で算出した。なお、リポソームを投入する緩衝液は、0.18M NaCl-0.02M phosphate buffer(pH 7.6)を0.02M phosphate buffer(pH 7.6)で段階的に希釈していろいろの程度の低浸透圧溶液を作成した。なお実際の浸透圧はオスモメーター(Fiske, Needham Heights, Mass.)にて実測した。

結 果

I. リポソームの低浸透圧対応変化の追跡

一定の溶質を保持させたりポソームを急激に低浸透圧溶液にさらすと外部の水が流入して膨化してバーストし、中に保持された溶質が流出することが考えられる。この変化をサブセコンドレベルで追跡するため、親株の総脂質で作成したりポソームについてストップトフロー装置を応用した。

Fig. 1に示すごとく、360mOsmから180mOsmの低浸透圧にした直後から水が急激にリポソーム内へ流入して膨化が始まり、400msecではほ

とんど完結した。これに対して CF の遊出は膨化の起始点より約 50msec 遅れて始まり、40sec 程度継続した。

Fig. 2 は、L 型菌の総脂質を供試した場合である。膨化は約 600msec で完結した。CF の遊出は膨化の起始点より約 50msec 遅れて始まり、その完結には約 1 分を要した。

Fig. 3 は、*M. orale* の総脂質を供試した場合である。Fig. 3 からは読み取れないが、膨化の完結には約 6 秒かかった。また、CF の遊出は膨化の起始点より約 100msec 遅れて始まり、約 2 分で完結した。

II. 蛍光色素遊出法による脂質人工膜の対浸透圧安定性測定

1) まず親株と L 型菌および *M. orale* の総脂質を用いて、前述 V の方法で蛍光色素遊出法を行った結果を Fig. 4 に示した。横軸の浸透圧落差を与えた時の CF 遊出量を、全トラップ量に対する % で表わした。親株では 160mOsm 浸透圧差によって 17.4% の CF が遊出し、320mOsm の浸透圧差では 44.0% が遊出した。一方 L 型菌では、160mOsm の浸透圧差により 16.4% の CF が遊出し、320mOsm の浸透圧差では 43.0% の遊出が認められた。*M. orale* においては、160mOsm の浸透圧差により 13.0% の CF が遊出し、320mOsm の浸透圧差でも 38.0% が遊出するのみであった。

以上の結果から、親株、L 型菌、*M. orale* の順に、同じ浸透圧差に対して CF 遊出量が少なくなることがわかった。

2) Fig. 5 は親株と L 型菌のリン脂質を用いた場合の結果である。親株、L 型菌の CF 遊出 % を見ると、160mOsm の浸透圧差では、順に 20.9%，14.9% であり、320mOsm の浸透圧差では、それぞれ 57.1%，47.9% であった。親株と L 型菌ではリン脂質が細胞膜の主要構成成分であるため、両者の対浸透圧安定性の差がより顕著に表われた。

Fig. 6 は、分画精製した親株および L 型菌由来の PG と CL で作製したリポソームを供試した結果である。親株由来の PG のリポソームは、160mOsm の浸透圧差により 29.3% の CF が遊出し、320mOsm の浸透圧差では 70.1% が遊出した。と

ころが同様に親株由来の CL のリポソームでは、160mOsm の浸透圧差により 14.6%，320mOsm の浸透圧差でも 47.0% が遊出するのみであった。なお、親株の PG に対する L 型菌の PG、親株の CL に対する L 型菌の CL を比較するとほとんど差は認められなかった。すなわち親株と L 型菌の PG、CL 画分では脂肪酸の差異による影響も考えられたが、上記の如く大差ないことが明らかとなったので、成分の大半を占め収量のよい親株の PG および L 型菌の CL を以後の実験に供試した。そして、親株の PG と L 型菌の CL を等量混和したリポソームは、ほぼ PG リポソームと CL リポソームの中間の CF 遊出量であった。

3) 対浸透圧安定性における二価カチオンの影響をみるため、10mM CaCl_2 (Ca^{2+} と略す) および 10mM MgCl_2 (Mg^{2+} と略す) を添加してリポソームを作製し検討した。Fig. 7 は、親株のリン脂質を用いて二価カチオンの影響をみたものである。CF 遊出量を比較すると、160mOsm の浸透圧差により、無添加の場合は 20.9% であるが Ca^{2+} を添加すると 15.3%， Mg^{2+} を添加すると 17.5% に抑えられた。320mOsm の浸透圧差では、57.1% が、それぞれ 42.4%，50.2% となった。

次に、L 型菌のリン脂質を供試した場合の結果を Fig. 8 に示した。同様に CF 遊出量で比較すると、160mOsm の浸透圧差により無添加の場合は 14.9% であるが、 Ca^{2+} を添加すると 3.8%， Mg^{2+} を添加すると 8.3% になり、320mOsm の浸透圧差では、47.1% が、それぞれ 21.1%，36.5% となり、特に Ca^{2+} によって大きく抑えられたことがわかる。

以上のごとく、リポソームの種類によって差はあるものの、二価カチオンの添加が、対浸透圧安定性の増強に、貢献していることは明らかである。

4) 次にコレステロールによる影響を検討した。一例として、分画精製した親株由来の PG と L 型菌由来の CL を等量混和して作製したリポソームに、50% コレステロールを添加した結果を Fig. 9 に示した。PG : CL = 1 : 1 のリポソームは 160mOsm の浸透圧差により 25.5% の CF が遊出したが、50% コレステロールを添加したリポ

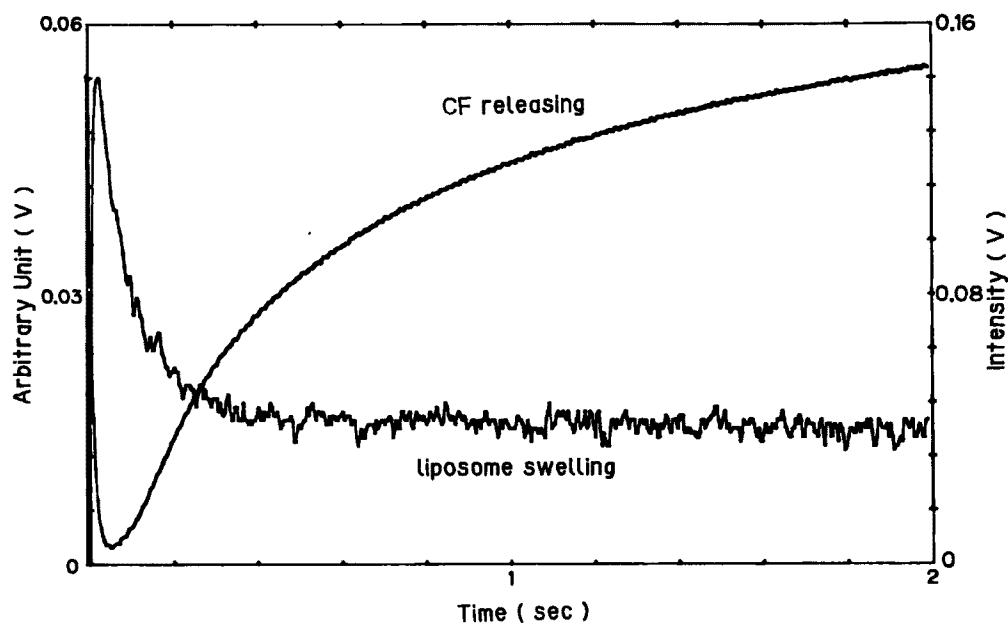


Fig. 1 Follow-up of swelling and carboxyfluorescein release of total lipid liposome of *S. aureus* 209P by Stopped flow spectrophotometer.

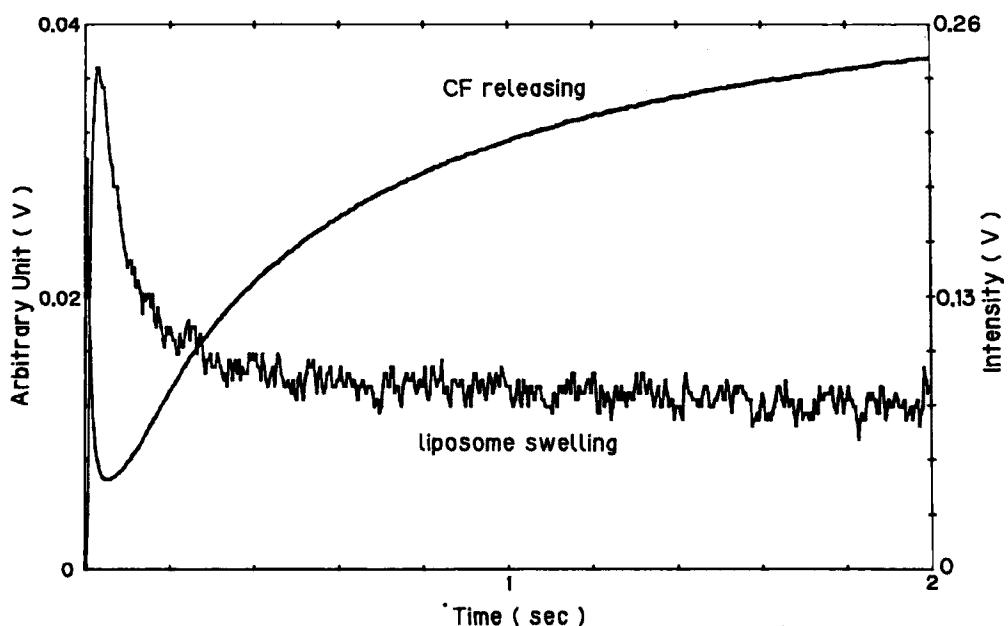


Fig. 2 Follow-up of swelling and carboxyfluorescein release of total lipid liposome of *S. aureus* 209P L-form by Stopped flow spectrophotometer.

ソームでは12.2%のCF遊出量であった。同様に320mOsmの浸透圧差では、無添加の場合の56.4%が、42.3%に抑制された。

以上の全結果を対比するために、50%のCFの遊出を起こさせうる浸透圧落差を求めてTable

1に示した。最高落差320mOsm以上になる場合は、外挿値をとり()で示した。総脂質で比較すると、親株は350mOsm、L型菌は375mOsm、そして*M. orale*は、405mOsmであり、親株よりもL型菌、さらに*M. orale*のリポソームがよ

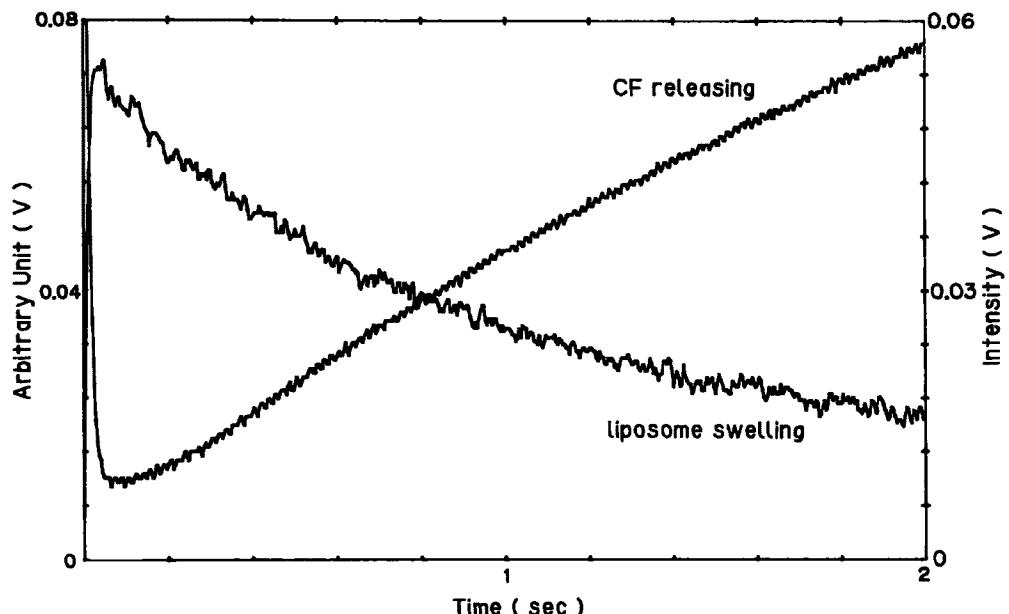


Fig. 3 Follow-up of swelling and carboxyfluorescein release of total lipid liposome of *M. orale* by Stopped flow spectrophotometer.

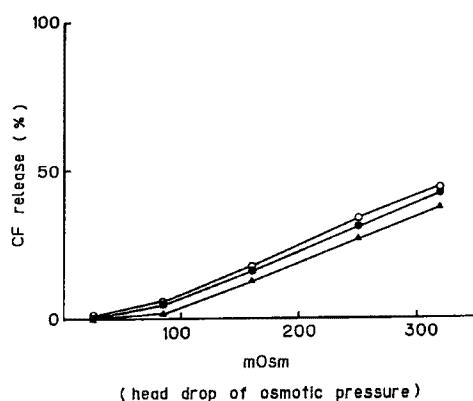


Fig. 4 Stability of total lipid liposomes of *S. aureus* 209P, its L-form and *M. orale* for the differences of osmotic pressure.

○: Parent, ●: L-form, ▲: *M. orale*

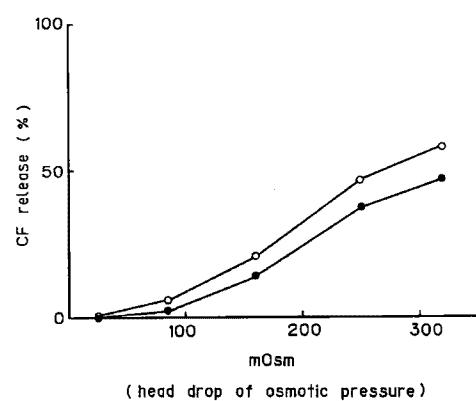


Fig. 5 Stability of phospholipid liposomes of *S. aureus* 209P and its L-form for the differences of osmotic pressure.

○: Parent, ●: L-form

り安定であることがわかる。また、PGは220mOsm程度で、CLは340mOsm程度で50%のCFが遊出し、CLのリポソームの方が圧倒的に浸透圧抵抗性が高く、安定なことが明らかとなった。

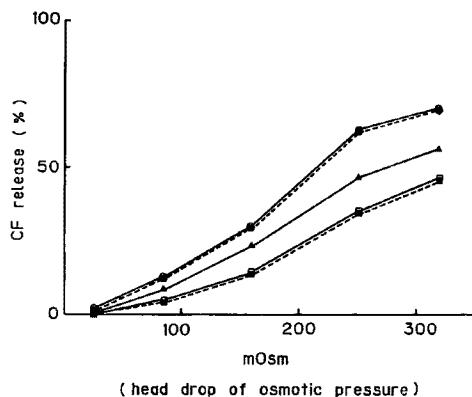


Fig. 6 Stability of PG, CL and mixed PG-CL liposomes of *S. aureus* 209p and its L-form for the differences of osmotic pressure.
 ○: PG (Parent), □: CL (Parent),
 ●: PG (L-form), ■: CL (L-form),
 ▲: PG:CL(1:1)

考 察

生体膜は脂質とタンパク質を主成分としているが、中でも基本構造の保持と機能発現に重要な役割をしている物質はリン脂質である。したがって細胞膜の構造と機能を物性論的に解析す

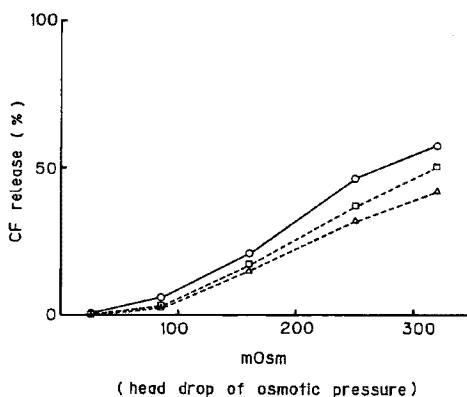


Fig. 7 Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the stability of phospholipid liposomes of *S. aureus* 209P for the differences of osmotic pressure.
 ○: Parent (PL), △: P(PL)+10mM CaCl_2 , □: P(PL)+10mM MgCl_2

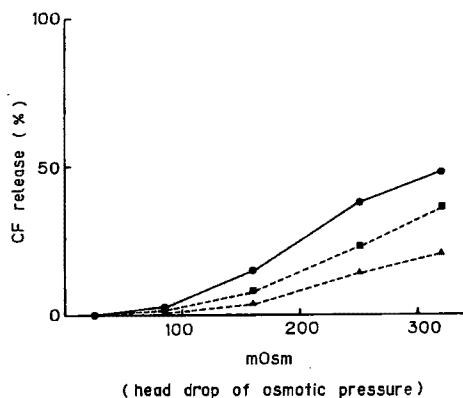


Fig. 8 Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the stability of phospholipid liposomes of *S. aureus* 209P L-form for the differences of osmotic pressure.
 ●: L-form(PL), ▲: L(PL)+10mM CaCl_2 , ■: L(PL)+10mM MgCl_2

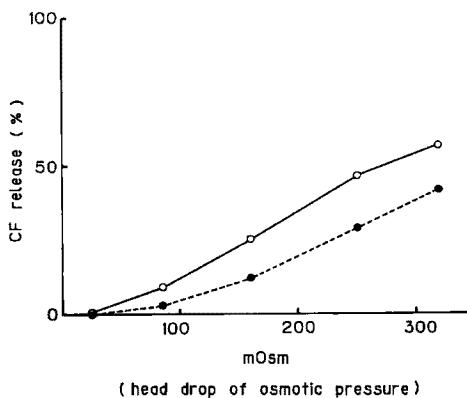


Fig. 9 Effect of addition of Cholesterol on the stability of mixed PG-CL liposomes of *S. aureus* 209P and its L-form for the differences of osmotic pressure.
 ○: PG:CL(1:1), ●: PG:CL(1:1)+50% Ch

Table 1 Head drop values of osmotic pressure giving 50% release of carboxyfluorescein trapped in liposomes.

Lipid	<i>S. aureus</i> 209P Parent	<i>S. aureus</i> 209P L-form	<i>Mycoplasma</i> <i>oryale</i>
Total lipid	(350)	(375)	(405)
Phospholipid (PL)	275	(340)	—
PG	218	220	—
CL	(340)	(345)	—
PL+10mM CaCl ₂	(375)	(625)	—
PL+10mM MgCl ₂	(318)	(400)	—
PG : CL (1 : 1)	275	—	—
PG : CL (1 : 1) + 50% Ch	(365)	—	—

ることは、細胞表層の基本活動を分子レベルで理解するために不可欠なことである。その膜物性の研究方法には、①細胞膜をそのまま材料とする場合^{12)~14)}、②細胞膜より分離精製した脂質を用いる場合¹²⁾、③合成リン脂質によるモデル解析^{15)~19)}などがある。そして膜の物性論的解析法には示差走査熱量測定(DSC)、電子スピン共鳴(ESR)、核磁気共鳴(NMR)など多くの方法が研究開発されているが^{11)~19)}、いずれも合成リン脂質を用いたモデル実験によらなければ良好な結果を得ることができない。

ちなみに、著者らはDSCを用いた相転移温度測定により、黄色ブドウ球菌の細胞壁欠落にともなう膜構成リン脂質組成適応変化の物性論的検討を行った¹⁹⁾。黄色ブドウ球菌の細胞膜の主要リン脂質はPGとCLで、相対含量比はそれぞれ70~80%と5~15%であるが、細胞壁を欠落してオートプラスト化したりL型菌になると、この比率が逆転して20~30%および50~60%になる^{6)~10)}。この脂質組成を反映させた膜モデル実験を合成PGと合成CLを用いて行い、CL增加の意義を検討した¹⁹⁾。その結果、細胞壁を欠落した黄色ブドウ球菌ではCLの著増が相転移温度上昇をもたらし、分子の流動性が制限されて膜硬化が起こることを明らかにすことができた。しかし、DSCの感度・精度の点からリン脂質構造の均一性が要求されるため、供試菌から分離精製した生体系で行うことは不可能であり、前述のごとくモデル実験の域を脱することができなかった。

過去において膜物性に多角的な検討を加えて

きた経験から、著者は細胞壁欠落にともなう細菌細胞膜の安定性を検討するには、細胞内圧が高い点を考慮して、細菌からの抽出脂質をそのまま供試したりポソームの低浸透圧に対する安定性を検討することが最も妥当であると考えた。その方法として、蛍光色素遊出法を導入することを計画した。これはリポソーム内に高濃度にトラップされた水溶性蛍光色素であるカルボキシフルオレッセイン(CF)が、遊出して希薄溶液化した場合に強い蛍光を発することを指標とするものである。同法は、保田らが糖脂質抗体測定法²²⁾に、また Weinstein、沖増らは相転移遊出法^{23)、24)}に応用しているが、著者は一定量のCFをトラップしたりポソームを作製し、いろいろの程度の低浸透圧溶液へ投入してバーストさせ、遊出して発現する蛍光量を測定する方法を考案した。

本蛍光色素遊出法は、マーカーとして高濃度では自己消光を起こし蛍光を発しないが、希薄溶液では蛍光を発するCFを用いるため、その濃度が問題となる。著者がトラップに用いた0.2M CFは完全に自己消光レベルであるが、遊出により希薄溶液化した時には蛍光発色に全く自己消光がみられないリポソーム量である必要がある。著者の用いた量は1mgの脂質から作製したりポソームのうち1/1000量を緩衝液1000μlに投入したので、トラップCFが全部遊出しても自己消光は全く起こらない系であることを段階希釈法にて確認した。したがってCFの全トラップ量に対する遊出割合で測定結果を検討することに妥当性があることを確認できた。

ところで、CFをトラップしたりポソームを低張に移した場合、いかなる現象が起きてCFが遊出するかを正確に追跡しておく必要があると考えた。それには、サブセコンドオーダーの解析が行えるストップトフロースペクトロフォトメーターが最適である³¹⁾。同装置でリポソームの体積変化とCF蛍光増加を追跡したところ、物理的変化としては、急激な水分流入によりリポソームの体積変化が起こり始め、短時間(50~100 msec)のlagの後、リポソームが抗しきれなくなってバーストを始めるためCFが遊出することを明らかにできた。しかも、各供試菌の総脂質

で作製したリポソームを用いて検討したところ、親株、L型菌そして *M. orale* の順に膨化の完結に要する時間が長くなつた。これはリポソーム膜を通過する水の流入速度差に起因するものと考えられる。

膨化の結果、抗しきれなくなつてリポソームがバーストしてCF遊出が起るが、最も時間を要した *M. orale* の総脂質リポソームの場合でも2分で完結した。したがつて本蛍光色素遊出量測定では、低浸透圧緩衝液に投入後2~10分の間のプラトーライフタイムを求めたので、CF遊出が完全に終了した量を測定したことになり、極めて合理的な方法であると確認できた。

ところで、細菌は単細胞であるため、外部環境や細胞構造の変化に対し膜脂質組成を大きく変える適応変化が認められている^{1)~4)}。特に、強固な細胞壁を欠落したオートプラストや細胞壁を欠落しても細胞分裂を行つて増殖できる安定L型菌は、その適応変化が著明であり好個の材料であると言える^{5)~10)}。また元々細胞壁を有さず裸膜で存在しているマイコプラズマは、特殊な組成をしており非常に興味深い³²⁾。

黄色ブドウ球菌の親株においては通常の培養時にはカルジオリピンは数%を占めるに過ぎないが、細胞壁欠落のオートプラストおよび安定L型菌では50~75%にもカルジオリピンの著増する事実がある^{8),10)}。一方マイコプラズマは元來細胞壁を有さず生育できる特殊な菌であり、*M. orale* においては総脂質中約30%をコレステロールが占めていることが明らかとなつてゐる³²⁾。

以上の各菌株の細胞膜脂質組成の特徴をふまえた上で、このたび開発した蛍光色素遊出法による検討を行つた。その結果、親株の総脂質リポソームとL型菌の総脂質リポソームでは大差はなかつたものの、*M. orale* の総脂質のリポソームは同じ浸透圧差に対してCFの遊出量が圧倒的に少なく、より対浸透圧安定性の高いリポソームであることがわかつた。

次に親株とL型菌については膜系脂質のみに精製する必要があると考え、分画したリン脂質系で行ってみると、親株よりもL型菌のリポソームの方が明らかに対浸透圧安定性が高く、安定であるという確証が得られた。

それではリン脂質中で特に膜安定性に貢献している分子種は何であるかを知る目的で、主成分でありしかも組成変動の大きなPGとCLを親株およびL型菌より分画精製し、そのリポソームについて検討した。PGのみのリポソームに比べCLを加えると安定性が増し、CLのみのリポソームは更に安定であった。したがつて、CLが膜の安定性に大きく寄与していることが明確となつた。しかも、二価カチオンの添加により親株、L型菌いずれのリン脂質リポソームも対浸透圧安定性の増強が認められたが、特にCa²⁺の影響が大であるという事実も把握できた。またリン脂質のみの系にコレステロールを添加する再構成実験により、対浸透圧安定性の増強がみられた事から、コレステロールの膜安定性への寄与も明らかにできた。

浸透圧差によるリポソームのバースト実験は、菌から抽出・精製した脂質を用いるため、より細菌細胞膜に近い状態の人工膜での安定性の比較を行うことができ、対浸透圧安定性測定は膜形態維持能力の比較にはより実際を模した最適の方法であるといえる。

結 語

蛍光色素遊出法を応用して、細菌細胞膜の対浸透圧安定性測定法を確立した。黄色ブドウ球菌およびその安定L型菌と、*M. orale* を供試菌として検討を行つた結果、以下の如き結論を得た。

- 1) 浸透圧差によるリポソームのバースト実験は、菌から抽出・精製した脂質を用いるため、より細菌細胞膜に近い状態の人工膜での安定性の比較を行うことができ、対浸透圧安定性測定は膜形態維持能力の比較にはより実際を模したものであるといえる。
- 2) *S. aureus* 209P(親株)、その安定L型菌(L型菌)および*M. orale* のリポソームを用いた実験では、親株、L型菌、*M. orale* 由來の順に浸透圧差に対してCFの流出量が少なくなった。すなわちこれが、膜の安定性を表現するものと考えられる。
- 3) 脂質の分画・再構成実験で、CL自身が細菌細胞膜安定性に大きく寄与していることが明ら

かとなった。

4) 細胞壁を有さず生存している *M. orale* は、その総脂質中約30%を占めるコレステロールの存在により、さらに安定性の高い細胞膜を有することも明らかにできた。

謝 詞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導を賜わりました金政泰弘教授に深甚の謝意を表します。

また実験を進めるにあたり種々御協力をいただきました細菌学教室各位に深く感謝いたします。なお、ストップトフロースペクトロフォトメーター測定および解析をお受け下さいました大阪大学基礎工学部金政利幸博士に深謝いたします。

本論文の要旨は、第59回日本細菌学会総会、第28回日本脂質生化学研究会において発表した。

文 献

1. Joyce GH, Hammond RK and White DC : Changes in membrane lipid composition in exponentially growing *Staphylococcus aureus* during the shift from 37 to 25C. *J. Bacteriol.* (1970) 104, 323-330.
2. Haest CWM, De Gier J, Op Den Kamp JAF, Bartels P and Van Deenen LLM : Changes in permeability of *Staphylococcus aureus* and derived liposomes with varying lipid composition. *Biochim Biophys Acta* (1972) 255, 720-733.
3. 奥山治美：生体膜脂質と環境。膜 (MEMBRANE) (1978) 3, 13-25.
4. Taneja R, Malic U and Khuller GK : Effect of growth temperature on the lipid composition of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. *J Gen Microbiol* (1979) 113, 413-416.
5. Ward JB and Perkins HR : The chemical composition of the membranes of protoplasts and L-forms of *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* (1968) 106, 391-400.
6. Kanemasa Y, Yoshioka T and Hayashi H : Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim Biophys Acta* (1972) 280, 444-450.
7. Kanemasa Y, Katayama K, Hayashi H, Takatsu T, Tomochika K and Okabe A : The barrier role of cytoplasmic membrane in salt tolerance mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1. Abt. Suppl (1976) 5, 189-201.
8. Hayami M, Okabe A, Kariyama R, Abe M and Kanemasa Y : Lipid composition of *Staphylococcus aureus* and its derived L-form. *Microbiol Immunol* (1979) 23, 435-442.
9. Hayami M, Okabe A, Sasai K, Hayashi H and Kanemasa Y : Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. *J Bacteriol* (1979) 140, 859-863.
10. Okabe A, Hirai Y, Hayashi H and Kanemasa Y : Alteration in phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* during formation of autoplast. *Biochim Biophys Acta* (1980) 617, 28-35.
11. 植木龍夫, 大西俊一, 阿久津秀雄, 江極好正, 高木俊夫, 小山 泰, 葛西道生, 権田金治：物理学的方法による生体膜構造の研究；生化学実験講座 14 生体膜, 日本生化学会編, 東京化学同人, 東京(1977)pp25-117.
12. Steim JM, Tourtellotte ME, Reinert JC, McElhaney RN and Rader RL : Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. *Biochemistry* (1969) 63, 104-109.
13. Melchior DL, Marowitz HJ, Sturtevant JM and Tsong TY : Characterization of the plasma membrane of *Mycoplasma laidlawii*. *Biochim Biophys Acta* (1970) 219, 114-122.
14. Sackmann E, Trauble H, Galla HJ and Overath P : Lateral diffusion, protein mobility, and phase transition in *Escherichia coli* membranes. A spin label study. *Biochemistry* (1973) 12, 5360-5369.

15. Huang CH, Sipe JP, Chow ST and Martin RB : Differential interaction of cholesterol with phosphatidylcholine on the inner and outer surfaces of lipid bilayer vesicles. *Proc Nat Acad Sci USA* (1974) **71**, 359-362.
16. Kornberg RD and McLennan HM : Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* (1971) **10**, 1111-1120.
17. Van Dijck PWM, Th. Ververgaert PHJ, Verkleij AJ, Van Deenen LLM and De Gier J : Influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the thermotropic behaviour and permeability properties of liposomes prepared from dimyristoyl phosphatidylglycerol and mixture of dimyristoyl phosphatidylglycerol and dimyristoyl phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* (1975) **406**, 465-478.
18. McElhaney RN : The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem Phys Lipids* (1982) **30**, 229-259.
19. Nagamachi E, Kariyama R and Kanemasa Y : The effect of head group structure on phase transition of phospholipid membranes as determined by differential scanning calorimetry. *Physiol Chem Phys Med NMR* (1985) **17**, 255-260.
20. Weinstein JN, Yoshikami S, Henkart P, Blumenthal R and Hagins WA : Liposome-cell interaction : Transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science* (1977) **195**, 489-492.
21. Szoka Jr. Fc, Jacobson K and Papahadjopoulos D : The use of aqueous space markers to determine the mechanism of interaction between phospholipid vesicles and cells. *Biochim Biophys Acta* (1979) **551**, 295-303.
22. 保田立二, 内藤祐子, 多田隈卓史 : リポソーム膜損傷反応を利用する糖脂質抗体の微量簡便測定法 : 免疫実験操作法Ⅸ, 日本免疫学会編, 日本免疫学会, 金沢 (1980) pp2989-2994.
23. Weinstein JN, Klausner RD, Innerarity H, Ralston E and Blumenthal R : Phase transition release, a new approach to the interaction of proteins with lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* (1981) **647**, 270-284.
24. OKimasu E, Shiraishi N, Kobayashi S, Morimoto Y, Miyahara M and Utsumi K : Permeability changes of phospholipid liposomes caused by pancreatic phospholipase A₂ : Analysis by means of phase transition release. *FEBS Lett* (1982) **145**, 82-86.
25. 江田 享, 松岡俊介, 田所一郎 : ブドウ球菌 L-form に関する研究II. ブドウ球菌 L-form の液体培養とその形態について. *日細菌誌* (1972) **27**, 795-800.
26. Chanock RM, Hayflick L and Barile MF : Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumoniae and its identification as a PPLO. *Proc Natl Acad Sci USA* (1962) **48**, 41-49.
27. Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* (1957) **226**, 497-509.
28. Rouser G, Kritchevsky G and Yamamoto A : Lipid chromatographic analysis; Marinetti GV ed., Dekker, New York (1967) 1, pp99-162.
29. Bligh EG and Dyer WJ : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* (1959) **37**, 911-917.
30. Ralston E, Hjelmeland LM, Klansner RD, Weinstein JN and Blumenthal R : Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions : Effect of impurities, and purification of the dye. *Biochim Biophys Acta* (1981) **619**, 133-137.
31. Kometani T and Kasai M : Ionic permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles measured by light scattering method. *J Memb Biol* (1978) **41**, 295-308.
32. 基田祥三 : *Mycoplasma orale* の膜脂質について, 岡山医誌 (1982) **94**, 943-949.

**Studies on anti-osmotic stability of bacterial membrane lipids
by carboxyfluorescein release.**

Eiko NAGAMACHI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

I have developed a method for measuring the anti-osmotic stability of liposomes prepared with lipids extracted from bacteria, using the release of carboxyfluorescein trapped in liposomes as an indicator. I also examined the sub-second physical changes of liposomes submerged in a solution of low osmotic pressure with a stopped flow spectrophotometer. The trapped carboxyfluorescein was released when the liposomes burst upon the inflow of excess water. Liposomes prepared with the lipids of a stable *S. aureus* L-form strain or *Mycoplasma orale* were more resistant to osmotic pressure than those prepared from the wild strain of *S. aureus*. It was found that cardiolipin enhanced the membrane-stability in *S. aureus* and cholesterol (about 30% of the total membrane lipids) in *Mycoplasma orale*. By the present method, the resistibility of membranes to low osmotic pressure could be determined precisely with extracted and purified bacterial membrane lipids.