

高分子化リポソームの合成と利用

Syntheses and Applications of Polymerized Liposomes

北 野 博 巳*

Hiromi Kitano

1. 緒 言

生体中に見られる巧妙なシステムを、人工的な化合物やその組み合わせにより模倣、再現しようという“Biomimetic Chemistry”の興隆と共に、化学者達はその研究対象を核酸や酵素から次第に広げて現在では、各種成分の複合体である細胞膜の機能のモデル化に大きな関心が集まっている¹⁾。古く Banghamらにより、生体由来のリン脂質を水中に分散させると二分子膜小胞体（リポソーム）が形成される事が示されていたが²⁾、1977年に、従来のリン脂質のほかに、二本の長鎖アルキル基を有する四級アンモニウム塩型の電解質が、水中に懸濁、超音波処理することにより細胞膜に類似の二層構造をとることが発見され³⁾、以来細胞膜モデルの研究は非常な進歩をみせた。実際の細胞膜は、Singerらにより提唱された“脂質の二重層とそれに浮かびあるいは貫いているタンパク質からなる構造”（流動モザイクモデル）⁴⁾を基本骨格とし、それが赤血球膜のスペクトリンに代表される裏打ちタンパク質や、オリゴペプチドで架橋された多糖類等により物理的に補強され、細胞の構造を維持するための境界形成、物質の輸送、エネルギー変換、情報伝達等数多くの機能を果たしている。細胞膜のモデルにおいても、このような物理的強度の増大を狙って、重合可能な基をリポソームを形成しうる両親媒性物質の中に導入し、光やラジカルなどを開始剤として重合させる試みがなされてきた。Khoranaらにより1979年にジアゾ基を導入したリン脂質からなるリポソームが、照射により脂質間架橋を起こすことが示されたが⁵⁾、膜中の脂質を高分子化により厳密に空間固定しようという試みとしては、同じ年に Ringsdorf らのグループによりジアセチレン基を含む長鎖を二本持つアミンの懸濁液を照射することにより安定なリポソームが形成される

ことが報告された⁶⁾。これとほぼ期を一にして、ジアセチレン基をリン脂質であるレシチンのアルキル基中に導入したものを光重合させることにより安定な細胞膜モデルが得られたことが報告されるなど⁷⁾、各国において精力的な研究がなされてきた⁸⁻¹⁵⁾。ここでは、高分子化リポソームに関するこれまでの研究を概説し、さらに重合性の両親媒性物質を用いての単分子膜についても随時ふれたい。

2. 高分子化リポソームの調製

2.1 重合性基を有する化合物からの調製

重合が可能でしかもリポソーム形成能も併せて持つ化合物の基本構造としては、図-1に示すように五つのタイプのものが考えられる^{12, 15)}。ここで●は電荷を持つ親水性部位、Xは重合可能基で図の右側には、重合後の構造も示してある。このような構造を持つ化合物を、

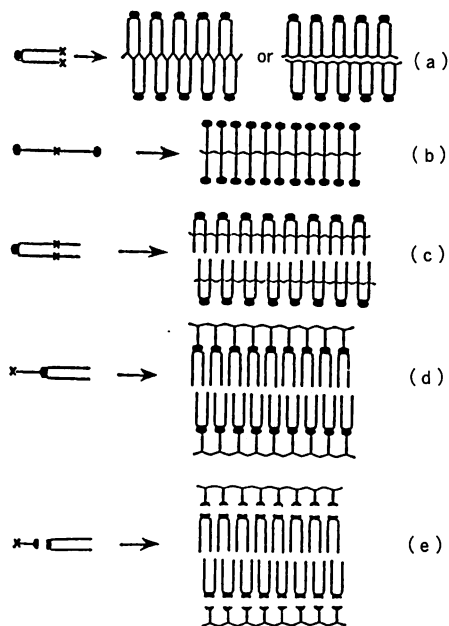


図-1 高分子化リポソームの調製法

* 京都大学工学部高分子化学教室助手

〒606 京都市左京区吉田本町

そのアルキル基が液晶状態になる温度において超音波照射、振とうなどにより水中に懸濁させリポソームを形成させた後に、光あるいはラジカル重合により高分子化するわけである。ジアセチレン基を含む(c)の構造をもつものでは、アルキル鎖が結晶状態に有る低温時にもみ光重合が進行するが、一般にはラジカル開始剤を用いるため、普通の高分子合成と同様に加熱して重合させる。この際に重合基の位置や数によりリポソームの形成や重合のしやすさに大きな影響があることは言うまでもない¹⁶⁾。

かさ高い平面を有するコレステロール基¹⁷⁾やアゾベンゼン基あるいはビフェニル基等を含むアクリル酸やメタクリル酸誘導体による高分子化リポソームも報告されており¹⁸⁾、側鎖中にかさ高い基を有すれば一本鎖のモノマーでも十分に高分子化リポソームを形成しうることを示している。(d)に類似の構造を有するモノマーのなかでもジオクタデシルメタクリルアミドのように非イオン性でしかもアルキル基を二本有するモノマーの場合には、アクリルアミドやアクリロイルグリシンアミドのような親水性の高いモノマーを95mol%程度加えて共重合体にし、これを水中に懸濁すると容易にリポソームが得られる^{10,18)}。またアルキル基と重合基間にエチレングリコールのオリゴマーを親水性スペーサーとして入れることにより安定な高分子化二重層膜が得られることが報告されている^{10,18,19)}。リポソームと並んで、細胞膜のモデルとされる単分子膜においても、親水性のスペーサーを導入したり、親水性のモノマーと共重合させることにより極めて容易に高分子化単分子膜が形成される²⁰⁾。

図-1の(e)に示すように、リポソームを形成する脂質中に重合基を入れる代わりに、逆イオンとして高分子電解質に配位させるという試みもある。たとえばジオクタデシルジメチルアンモニウムカチオンとメタクリル酸アニオンとの塩によりリポソームを調整しuv照射させたところ、重合後も重合前と同様の相転移温度を示すうえに図-1の(a)~(b)で示される脂質部分を高分子化したリポソームと同様に物理的に安定であった。しかも重合したものをクロロホルム-エーテルと混合させることにより内部の脂質が除去され中が空洞の“ゴーストベシクル”ができた^{21,22)}。同様にジセチレンホスフェートからなるリポソームを調整した後に4-ビニルピリジン、メタクリロイルコリンのようなカチオン性のモノマーを加え重合させる“liposomes in a net”という手法も報告されている²³⁾。

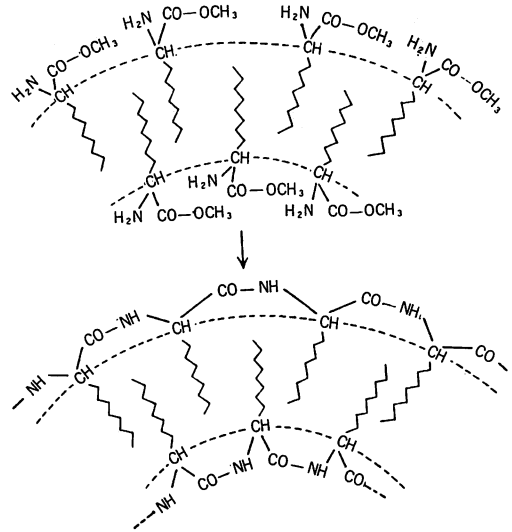


図-2 重縮合によるポリペプチドリポソームの調製法

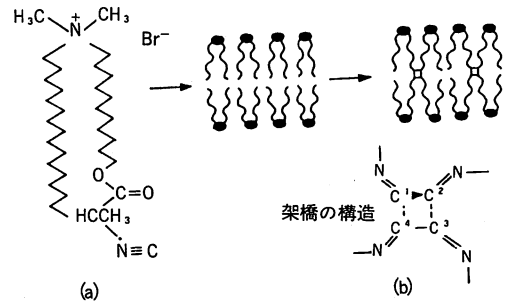


図-3 四員環生成による高分子化リポソーム

2.2 重合性基を持たない化合物からの調製

不飽和結合を持たぬ分子を出発物質としてリポソームを調製した例としては、疎水性側鎖を有するアミノ酸からなるリポソームをうすいアルカリ中に懸濁させアミノ基のエステル結合への求核反応により長鎖ポリペプチドが生成させた報告がある(図-2)²⁴⁾。重合反応は親水性部位での高いパッキング密度を駆動力として利用しており、このような形でのポリペプチド鎖の生成は生命の起源という面からもきわめて興味深い。

図-3(a)のような構造を持つモノマーを、ニッケルイオンを触媒として反応させると図-3(b)で示すようにアルキル鎖の末端で四員環を形成しテトラマーが集まったリポソームとなる²⁵⁾。フリーズフラクチャーによって高分子化の前後の構造を検討したところ、二層の炭化水素鎖の間に架橋が生ずるために、重合後の像は他の多くの高分子化リポソームや普通の低分子脂質からなるリポソームと異なり、半球状をとらずに輪状であ

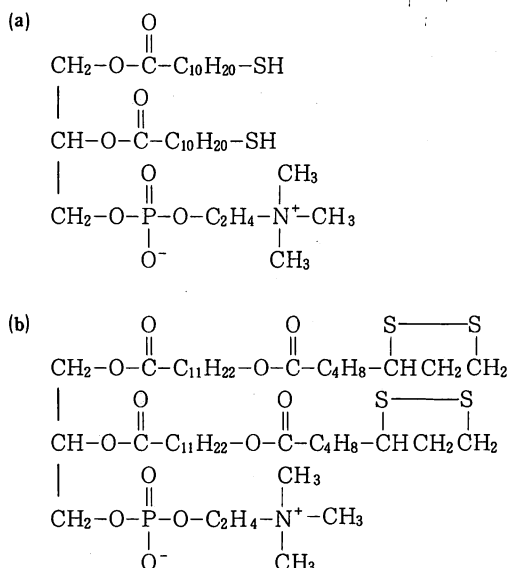


図-4 酸化還元反応を利用した高分子化リポソームの調製に用いるモノマーの構造

った。また Regen らのグループにより、図-4(a)で示されるようなチオール基を有するリピッドからなるリポソームの酸化、還元を利用したの重合、解重合も試みられている^{26,27)}。最近では、さらに二本のアルキル基にそれぞれポイル基を有するレシチンにより極めて穏和な条件下で、安定なリポソームが形成されることが報告されている(図-4(b))²⁸⁾。

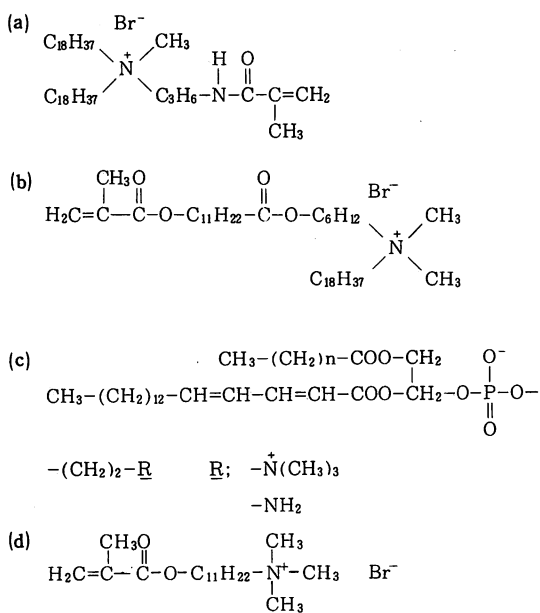


図-5 高分子化リポソームの調製に用いるモノマーの例

2.3 リポソームのサイズ、分子量

こうして得られた高分子化リポソームの大きさは電子顕微鏡観察によれば若干もとより縮むものの重合により大きくなることはない。分子量についてGPCを用いて評価したところ図-5(a)のような化合物では、重合度が約500で20-600個のポリマーが、また図-5(b)では、重合度が約500で20-160個のポリマーが一つのリポソームを形成していた²⁹⁾。またその分子量分布は、 $M_w/M_n = 4.4-9.3$ と非常に広がった。この分子量分布はリポソーム調製の際の超音波処理時間を長くすると狭くなる傾向がみられた³⁰⁾。リポソームの分子量は先に述べたようにモノマーの構造に大きく依存し、図-4(a)のチオール基を有するリポソームでは分子量が数十に^{26,27)}、また二本のアルキル鎖の中の片方にジェン基を有するレシチン(図-5(c))では、重合基を有しないアルキル鎖による立体障害のため4量体が生成するに留まった³¹⁾。

3. 高分子化リポソームの特性

3.1 透過特性

リポソームの重合を行うと物理的、化学的に膜としての機能に大きな変化が生じる。中でも物理的強度の増大により、エタノールや界面活性剤の添加にとともなる膜の破壊に対する抵抗力は飛躍的に増大する。一方で膜の内水相に閉じ込められた溶質の透過は重合により遅くなる。トリチウムでラベルしたグルコースをマーカーとして高分子化の影響を調べたところ、その透過速度は重合前の40-54%に低下した³²⁾。しかし蛍光測定から、重合による歪みで膜に割れ目が生じているとの報告もあり、これが“高分子膜”に対して予想されるより、溶質の透過減速の程度が小さい理由のひとつと考えられる。高分子化リポソームは物理的強度の

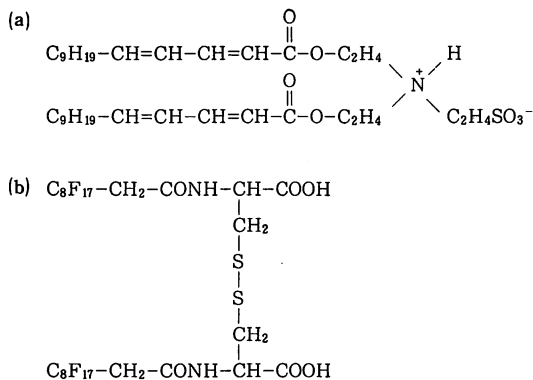


図-6 栓ぬき(uncorking)に用いた脂質の構造

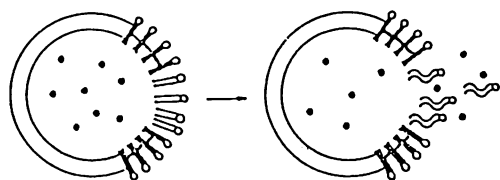


図-7 混合高分子化リポソームのuncorking

高いことや溶質透過が比較的遅いなど徐放性ドラッグキャリアーとして有望であるが、これとほかの低分子両親媒性物質の組み合わせでよりうまく透過のコントロールが行える。例えば重合性ジエン化合物(図-6(a))と、これと相容性がなくしかも非重合性で分子中にS-S結合を有する脂質(図-6(b))とで混合リポソームを作り光重合させた。これを還元剤を含む溶液中に懸濁させると、S-Sが還元切断されて親水性が増加するため、相分離していた膜表面のうちで6(b)の脂質部分がリポソーム外に溶出し、その跡は活性化マクロファージにより攻撃されたゴースト腫瘍細胞によく見られるような空孔となって残る(図-7)³³⁾。この栓ぬき(uncorking)の原理を利用して生分解性リピッドを含むような混合リポソームを作れば徐放性材料としての価値は更に高まると考えられる。同様の例として先にも述べたように二本のアルキル鎖中にそれぞれチオール基を一個ずつ含む脂質によるリポソームの例がある^{26,27)}。この場合過酸化水素による酸化反応とジチオスレイトール等による還元反応を利用して分子間でのS-S結合の生成、切断を行わせる事ができリポソームの重合、解重合が可能である。ジスルフィド基が親水性基のそばにあるときはジチオスレイトールが、また疎水部にある時には、オクタンチオールが還元剤として有効であった。このタイプの高分子化リポソームは今のところ重合度が低く、直鎖のポリマーであるために糖などの透過制御は出来ていないが、改良を加えることにより、免疫学、薬学等への幅広い応用が期待される³⁴⁾。

3.2 相転移

細胞膜の大きな特徴の一つとして脂質分子中の炭化水素鎖のゲル液晶相転移現象があるが、重合基を導入して高分子化した場合にこの相転移減少の消失がよく観察される。特に先に示した図-1中の(b)(c)そして(a)の多くの場合には、重合によって炭化水素鎖の自由度が大きく減少して相転移現象は消失する。ジアセチレン基を含む脂質の場合には、完全に重合すると相転移は起こらないが、部分重合では、色の温度変化(ther-

mochromism)が観測された³⁵⁾。一方(d)(e)のような構造を持つ場合には、高分子鎖が長鎖炭化水素鎖とは離れたところにあるため重合による影響は(a)-(c)に比べて遥かに小さく重合後も程度は小さいものの相転移が見られるものが多い。さらに(d)の構造で先の項でも述べたように重合基とアルキル基との間に親水性のスペーサーを入れてやれば重合の影響はもっと小さくなる。透過を含め細胞膜の機能の多くが相転移現象により大きく影響を受けることを考えると、細胞膜と類似の機能を期待する場合には、(d)や(e)のタイプのものが適していると思われる。重合による膜の流動性の変化は長鎖アルキル基の途中にスピラベルをもつものを用いてESR法によって確かめられている³⁶⁾。またプローブとしてエリスロシンをいれ、その異方性をみることも行われた。このほかりポソームの電気特性や、交流電場下での回転を調べた例もある³⁷⁾。

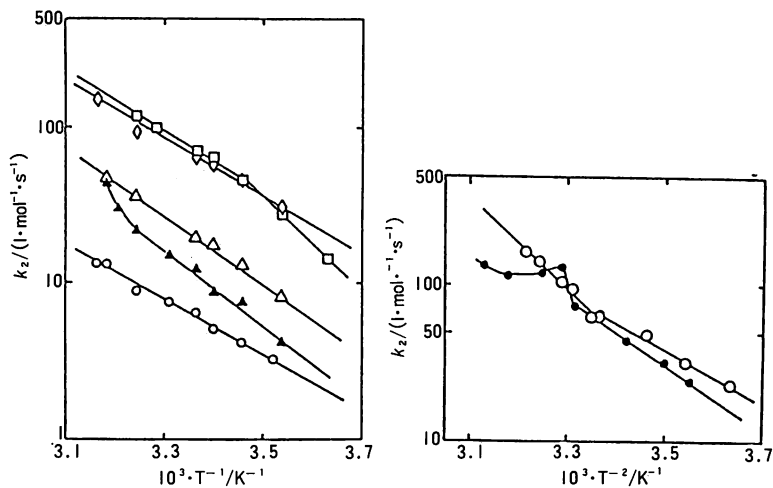
4. 高分子化リポソームの機能

4.1 触媒反応場としての利用

a. 加水分解への触媒効果

細胞膜の使命の最大のものは、言うまでもなく生命体を外界と隔てるといういわゆる空間の固定(compartmentation)であり、先に述べた透過の制御はそれに付随する機能としては重要なもののひとつである。ところで細胞膜の表面が生化学反応にとって極めて重要な場であることを考えるとリポソーム表面での反応に及ぼす影響を検討することも興味深い。そこでリポソーム表面で起こるエステル分解反応に対する、リポソーム高分子化の影響をみた³⁸⁾。アルキル鎖末端あるいは極性基の近傍に重合基をもつ二種類の化合物(図-5(a), (d))よりそれぞれ高分子化リポソームを調製し、アニオン性のフェニルエステルのアルカリ加水分解に対する触媒作用の検討を行った。この系のArrheniusプロットをとると、5(d)を重合させた物では、重合により不連続点が見られなくなるのに対して5(a)では程度は弱まるものの重合後も低分子リポソームや膜酵素による触媒作用と同様の不連続点が観測された(図-8)。この系に対する圧力の影響から反応の活性化体積 ΔV^\ddagger を算出したところ、リポソームの存在しない系に比べてその値が増加しており、リポソーム表面での活性錯合体の脱溶媒和作用が触媒活性発現の大きな原因となっていることを示した。

同様に中性のエステルのアルカリ加水分解やアミノリシスを検討したところ基質や水酸化物イオンとリポ



[基質] = 50 μM. [NaOH] = 1 mM
 (a) ○: 無添加 ◇: セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTABr) □: ジオクタデシルジ
 メジルアルモニウムブロマイド (DODABr)
 ▲: 5 (d) モノマー △: 5 (d) ポリマー
 (b) ●: 5 (a) モノマー ○: 5 (a) ポリマー

図-8 3-ニトロ-4-アセトキシ安息香酸のアルカリ加水分解の Arrhenius プロット

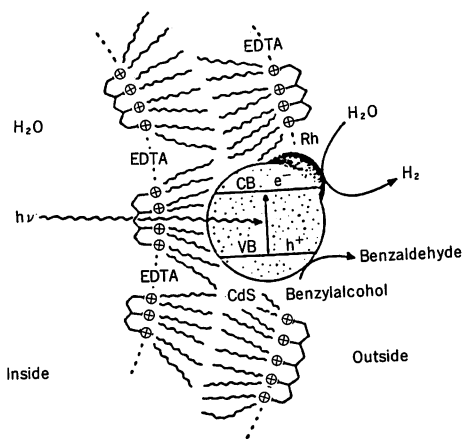


図-9 高分子化リポソーム中に封入された Rh-CdS による水素発生の様式図

ソームの会合定数は、重合により極性やパッキング状態が変わるのを反映して大きく変化していることがわかった³⁹⁾。また分子中に活性基としてアミノ基を有する重合性のカチオン性両親媒性物質では、カチオン性でしかも疎水性の反応場の存在によりアミノ基の求核活性が増大することにより自発的加水分解の3万倍以上の速度で反応が進行した⁴⁰⁾。しかも重合によってリポソーム表面の電荷とパッキングの密度が幾分増加することから触媒活性は重合後若干高くなった。

b. 光エネルギーの利用

リポソームの中に CdS と Rh を封入し光照射してやるとベンジアルコールなどを電子供与体にして水素が発生する。このリポソームを重合すると先にも述べたように歪みが生じ膜に割れ目ができる、CdSが水や電子供与体に近づきやすくなるため重合前に比べて量

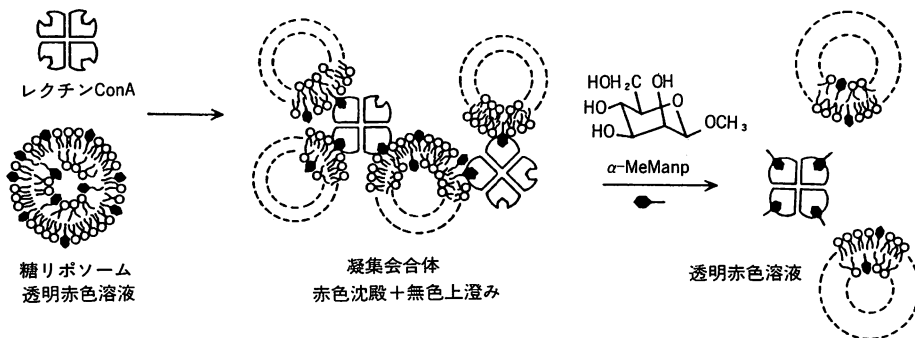


図-10 糖を有するリポソームの ConA による凝集とその解消

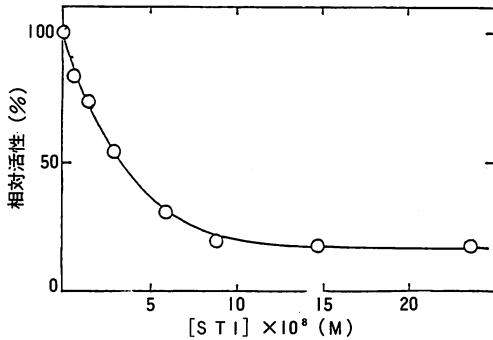


図-11 高分子化リポソームに固定化したトリプシンによる反応に対する、大豆トリプシンインヒビター固定化リポソームの阻害効果、 $K_i=3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、遊離系の $K_i \approx 10^{-10} \text{ M}$

子収率が増加するということである(図-9)⁴¹⁾。光エネルギーの利用という面で非常に興味を持たれる。

4.2 生化学的機能

a. 糖を有するリポソーム

より生化学的な応用を行った例として、Baderらは糖を極性部を持つ高分子化リポソームの溶液に糖を特異的に結合するレクチンの一つであるコンカナバリンA (ConA)を含む液を混合することにより、高分子化リポソームがテトラマーであるConAを介してすばやく凝集することや、低分子糖であるメチル- α -D-マンノピラノシドをきつ抗剤として加えることによる凝集の解消を報告している(図-10)⁴²⁾。この両親媒性物質のクロロホルム溶液を少量水の上に展開することで単分子膜を作り、その下の水相にConAを加えると、親水部の糖との会合によって単分子膜中の脂質の分子占有面積が飛躍的に増大した。

b. 酵素とリポソーム

アミノ基を有する高分子化リポソームの表面に、消化酵素トリプシンおよびこれと強い相互作用を有する大豆由来のタンパク質(トリプシンインヒビター)を別々に固定化してやると、二種類のリポソーム間での特異的会合が観測され、これに伴う酵素活性の減少がみられた(図-11)³¹⁾。タンパク質がともにリポソーム上に固定化されているため、立体障害に起因するタンパク間相互作用の減少がみられたが、酵素活性を指標とする定量的な取扱や、顕微鏡による直接観察⁴³⁾が可能であるなど、細胞-細胞間相互作用のモデルとして非常に興味を持たれる。

Bueschlらは天然の脂質と、これに相容性のある重合性脂質あるいは、相容性のない重合性脂質との混合

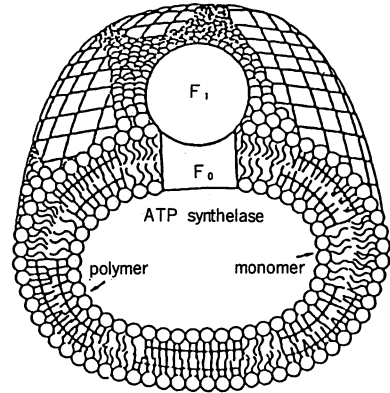


図-12 部分的に重合したリポソームへのATPase再構成

単分子膜を作り光重合させた後に、天然の脂質を加水分解する酵素ホスホリパーゼA₂を下の水相に入れた⁴⁴⁾。脂質同士が相容性の場合には殆ど分解が起こらないのに対して、相容性がなく単分子膜自体が相分離を起こしていると酵素による脂質の分解が進行した。このような天然脂質と適当な人工の重合性脂質の混合リポソームを用いての膜分解の制御は、先に述べた“uncorking”と同様に将来の薬剤徐放性材料を考える上で重要と思われる。

膜タンパクとして知られているATPase⁴⁵⁾、バクテリオロドプシン⁴⁶⁾、ロドプシン⁴⁷⁾などを高分子化リポソーム中に再構成する試みが行われた(図-12)。重合後もその活性は充分に残っているばかりか天然の脂質からなるリポソーム中よりも遥かに安定であった。このことは高分子化リポソームが膜タンパクの担体としての機能を充分に果たしうる事を示している。

c. *in vivo*での利用

重合性脂質を調製する際によく用いられるジアセチレン基を持つ脂肪酸を、培地にいれてバクテリアの培養を試みたところ、得られた細胞中の脂質の90%が重合性のもので占められていたという⁴⁸⁾。またこの細胞に光を照射するとジアセチレン基の部分で重合が起こるために細胞は赤や黄色に変色した。重合による細胞膜内の架橋は膜酵素の活性にも影響を与え、NADHオキシダーゼでは、60秒照射後にはもとの20%に活性が低下した。光重合性の脂肪酸によるこのような細胞膜の固定は、実用的にも極めて興味深い。

5. 終わりに

以上これまでの研究成果の概説を行った。高分子化リポソームは、先にも述べたように生化学的に見ても

細胞膜としての機能を十分に果たしうるものであり、しかも物理的に安定であるなど医学、薬学、工学など幅広い分野での発展、応用が期待される。

引用文献

- 1) J. H. Fendler, "Membrane Mimetic Chemistry" John Wiley, New York(1980)
- 2) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 3) T. Kunitake, Y. Okahata, *Chem. Lett.* 1977, 1377
- 4) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720(1972)
- 5) C. M. Gupta, R. Radhakrishnan, G. E. Gerber, W. L. Olsen, S. G. Quay, H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2595 (1979)
- 6) D. Day, H. H. Hub, H. Ringsdorf, *Isr. J. Chem.*, **18**, 325 (1979)
- 7) D. S. Johnston, S. Sanghera, M. Pons, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 57 (1980)
- 8) S. L. Regen, B. Czeck, A. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6638 (1980)
- 9) D. F. O'Brien, T. H. Whitesides, R. T. Klingbiel, *J. Polym. Sci. Polym. Lett.*, **19**, 95 (1981)
- 10) T. Kunitake, N. Nakashima, K. Takarabe, M. Nagai, A. Tsuge, H. Yanagi, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5945 (1981)
- 11) D. J. Kippenberger, K. Rosenquist, L. Odberg, P. Tundo, J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1129 (1983)
- 12) A. Akimoto, K. Dorn, L. Gross, H. Ringsdorf, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **20**, 90(1981)
- 13) H. Kitano, *Membrane (Maku)*, **10**, 279 (1985)
- 14) H. Bader, K. Dorn, B. Hupfer, H. Ringsdorf, *Adv. Polym. Sci.*, **64**, 1 (1985)
- 15) 小林四郎; 細胞膜機能のシミュレーション, 日本膜学会編, 喜多見書房 pp47 (1986)
- 16) E. Hasegawa, Y. Matsushita, K. Eshima, H. Nishide, E. Tsuchida, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **5**, 779 (1984)
- 17) I. Cho, K.-C. Chung, *Macromolecules*, **17**, 2935 (1984)
- 18) T. Kunitake, M. Nagai, H. Yanagi, K. Takarabe, N. Nakashima, *J. Macromol. Sci. Chem.* **A21**, 1237 (1984)
- 19) R. Elbert, A. Laschewsky, H. Ringsdorf, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4134 (1985)
- 20) A. Laschewsky, H. Ringsdorf, G. Schmidt, J. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 788 (1987)
- 21) S. L. Regen, J.-S. Singh, K. Yamaguchi, *ibid.*, **106**, 2466 (1984)
- 22) S. L. Regen, J.-S. Singh, *ibid.*, **106**, 5756 (1984)
- 23) K. V. Aliev, H. Ringsdorf, B. Schlarb, K.-H. Leister, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **5**, 345 (1984)
- 24) T. Folda, L. Gross, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **3**, 167 (1982)
- 25) M. F. M. Roks, H. G. J. Visser, J. W. Zwikker, A. J. Berkley, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4507 (1984)
- 26) N. K. P. Samuel, M. Singh, K. Yamaguchi, S. L. Regen, *ibid.* **107**, 42 (1985)
- 27) S. L. Regen, N. K. P. Samuel, J. M. Khurana, *ibid.*, **107**, 5804 (1985)
- 28) A. Sadownik, J. Stefely, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 7789 (1986)
- 29) K. Dorn, E. V. Patton, R. T. Klingbiel, D. F. O'Brien, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **4**, 513 (1983)
- 30) D. Bolikal, S. L. Regen, *Macromolecules*, **17**, 1287 (1984)
- 31) N. Kato, C.-H. Yan, H. Kitano, N. Ise, *Polym. Prep. Jpn.* in press
- 32) K. Dorn, R. T. Klingbiel, D. P. Specht, P. N. Tyminski, H. Ringsdorf, D. F. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1627 (1984)
- 33) R. Bueschl, T. Folda, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem. Suppl.*, **6**, 245 (1984)
- 34) 北野博巳; 表面, 印刷中
- 35) A. Singh, R. B. Thompson, J. M. Schnur, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2785 (1986)
- 36) A. Kusumi, M. Singh, D. A. Tirrel, G. Oehme, A. Singh, N. K. P. Samuel, J. S. Hyde, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 2975 (1983)
- 37) R. Benz, W. Prass, H. Ringsdorf, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **21**, 368 (1982), H. H. Hub, H. Ringsdorf, *ibid.*, **21**, 134 (1982)
- 38) H. Kitano, M. Katsukawa, N. Ise, K. Dorn, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem.*, **185**, 157 (1984)
- 39) T. Ishiwatari, J. H. Fendler, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1908 (1984)
- 40) H. Kitano, H. Ringsdorf, in preparation
- 41) Y.-M. Tricot, A. Emerson, J. H. Fendler, *J. Phys. Chem.*, **89**, 4721 (1985)
- 42) H. Bader, H. Ringsdorf, J. Skura, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **20**, 91 (1981)
- 43) H. Kitano, S. Iwai, N. Ise, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 1867 (1987)
- 44) R. Bueschl, B. Hupfer, H. Ringsdorf, *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **3**, 589 (1982)
- 45) N. Wagner, K. Dose, H. Koch, H. Ringsdorf, *FEBS Lett.*, **132**, 313 (1981)
- 46) R. Pabst, H. Ringsdorf, H. Koch, *ibid.*, **154**, 5 (1983)
- 47) P. N. Tyminski, L. H. Latimer, D. F. O'Brien, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7769 (1985)
- 48) J. Leaver, A. Alonso, A. A. Durrani, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta*, **727**, 327 (1983)