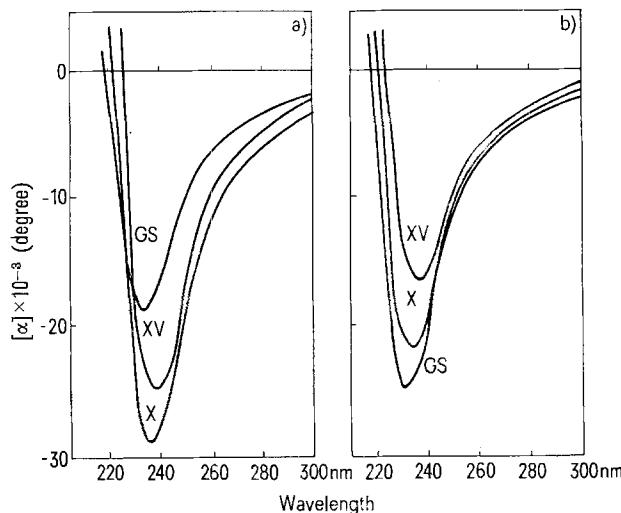


trifluoroacetate obtained was cyclized in pyridine. Purification through ion exchange columns followed by fractionation on silica gel gave *cyclo*-(Val-Orn(Z)-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Z)-MeLeu-D-Phe-Pro-) (IX) in 50% yield, mp 212–214°. Hydrogenolysis of IX afforded [MeLeu<sup>3</sup>]-GS·2HCl·2H<sub>2</sub>O (X), mp 237–239°,  $[\alpha]^{25}$ –272° (EtOH).

Boc-Val-Orn(Z)-MeLeu-D-Phe-Pro-NHNH<sub>2</sub> (XI) was prepared quantitatively by treatment of IV with hydrazine hydrate. Condensation of the azide derived from XI with VI gave Boc-Val-Orn(Z)-MeLeu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Z)-MeLeu-D-Phe-Pro-OH (XII), in 30% yield, which was converted to an amorphous Boc-decapeptide N-hydroxysuccinimide ester (XIII). After removal of the Boc group of XIII, the resulting decapeptide ester was treated in pyridine to yield *cyclo*-(Val-Orn(Z)-MeLeu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Z)-MeLeu-D-Phe-Pro-) (XIV) in 67.5% yield, mp 105–115°. The hydrogenation of XIV yielded [Di-MeLeu<sup>3,3'</sup>]-GS·2HCl·3H<sub>2</sub>O (XV), mp 233–235°,  $[\alpha]^{25}$ –236° (EtOH).

**Results and discussion.** In the antibacterial activities against microorganisms, both of the analogs (X and XV) were almost identical with GS in potency (Table). This indicated that the hydrogens on the NH of the leucine residues are not necessary for exhibiting the biological activity.



ORD of [MeLeu<sup>3</sup>]-gramicidin S (X), [Di-MeLeu<sup>3,3'</sup>]-gramicidin S (XV), and gramicidin S (GS). Solvent a) ethanol and b) 8 M urea.

In ORD studies, the curves of X and XV determined in ethanol are shown in Figure a along with that of GS. The shapes of the 3 ORD curves are very similar to each other. In 8 M aqueous urea, the positions of the troughs of the 2 analogs (X and XV) remained unchanged, as well as GS (Figure b). In both solvents, the dispersions of the 3 molecules are different in their minimum rotations, and only slightly in the positions of troughs, but the shape of curves are very similar even in 8 M urea, suggesting that all these 3 molecules have very similar and stable conformations. These results indicate that the 2 of the 4 hydrogen bondings in the  $\beta$ -type structure of GS proposed by several authors would not be necessary for stabilizing the conformation. Furthermore, another model, in which NH of the leucine residues does not participate in intramolecular hydrogen bondings, should be put forward. In this respect, as is mentioned by BALASUBRAMANIAN<sup>9</sup>, the mixed  $\alpha, \beta$ -structure of HODGKIN and OUGHTON<sup>1</sup> and the SCHERAGA's<sup>10</sup> model may not be disregarded. Further studies on this are in progress<sup>11</sup>.

**Zusammenfassung.** Nach Methoden der konventionellen Peptidsynthese wurden zwei Gramicidin S Analoga synthetisiert, in denen Leucin durch N-Methylleucin ersetzt ist. Beim antibakteriellen Test sind diese beiden Analoga praktisch gleich wirksam wie Gramicidin S und auch die Konformation dieser zwei Analoga ist derjenigen von Gramicidin S ähnlich.

H. SUGANO<sup>12</sup>, H. ABE<sup>13</sup>, M. MIYOSHI<sup>12</sup>, T. KATO<sup>13</sup>, and N. IZUMIYA<sup>13</sup>

Research Laboratory of Applied Biochemistry,  
Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Kashima-cho,  
Higashiyodogawa-ku, Osaka (Japan); and  
Laboratory of Biochemistry, Faculty of Science,  
Kyushu University, Fukuoka (Japan), 29 June 1973.

<sup>9</sup> D. BALASUBRAMANIAN, J. Am. chem. Soc. 89, 5445 (1967).

<sup>10</sup> G. VANDERKOOI, S. J. LEACH, G. NEMETHY, R. SCOTT and H. A. SCHERAGA, Biochemistry 5, 2991 (1966).

<sup>11</sup> The authors wish to express their thanks to Dr. I. CHIBATA of Tanabe Seiyaku Co., Ltd. for his encouragement in the course of this study. Thanks are also due to Associate Professor Y. MUKOHATA of Osaka University for help in ORD measurements, and to Dr. K. ENOMOTO of Tanabe Seiyaku Co., Ltd. for the biological assay.

<sup>12</sup> Research Laboratory of Applied Biochemistry, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Kashima-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka (Japan).

<sup>13</sup> Laboratory of Biochemistry, Faculty of Science, Kyushu University, Fukuoka (Japan).

## Réversibilité de la réponse du potentiel de membrane chez *Nitella flexilis* L. à des variations de pH

Les propriétés physiologiques des cellules jeunes de Charophyceae varient avec la saison, même lorsque ces cellules sont cultivées au laboratoire en conditions normalisées<sup>1–3</sup>. Nous avons observé pour un lot de cellules de *Nitella* un comportement électrophysiologique différent de celui noté les mois précédents. Il s'agit de la réponse du potentiel de membrane à un changement «aller-retour» du pH de la solution extérieure. Jusqu'à présent cette réponse n'était pas réversible du moins pendant les deux premières heures qui suivaient le rétablissement de la solution extérieure initiale<sup>4</sup>. A partir de fin avril, le potentiel de membrane a répondu d'une manière plus ou moins réversible suivant le pH testé. Ce comportement

nous a semblé assez révélateur des mécanismes de sélectivité de la membrane de *Nitella* aux ions.

**Matériel et méthodes.** Les essais ont porté sur les cellules internodales de l'algue d'eau douce *Nitella flexilis* L. cultivées au laboratoire depuis 10 mois (milieu II de FORSBERG<sup>5</sup>, photopériode 18 h). Les cellules utilisées sont prétraitées pendant 15 h dans une solution de

<sup>1</sup> H. BRECKHEIMER-BEYRICH, Ber. dt. bot. Ges. 67, 87 (1954).

<sup>2</sup> E. A. C. MACROBBIE, Aust. J. biol. Sci. 19, 371 (1966).

<sup>3</sup> F. A. SMITH, J. exp. Bot. 19, 442 (1968).

<sup>4</sup> C. GILLET and J. LEFEBVRE, *Ion Transport in Plants* (Ed. W. P. ANDERSON, Academic Press Inc., London 1973), p. 101.

Tableau I. Variations du potentiel de membrane (en mV) de *Nitella* lorsque le pH de la solution extérieure (0,1 mM KCl + 1,0 mM NaCl) est changé dans un sens puis dans l'autre. Moyenne pour 7 cellules. L'erreur standard pour chaque moyenne est généralement comprise entre 2 et 3.

pH	5,8-5,0	5,8-6,6	5,8-7,3*	5,8-8,0	5,8-9,0
Aller →	+23	-13	-20	-23	-22
← Retour	-23	+ 8	+10	0	+ 1

\* Même résultat en ajoutant un tampon bicarbonate au milieu.

1,0 mM KCl et de 0,1 mM NaCl. Le potentiel de membrane (plasmalemme et tonoplaste) est mesuré au moyen d'une microélectrode de verre remplie de 3 M KCl introduite dans la vacuole et raccordée par l'intermédiaire d'une pile au calomel à un électromètre Keithley 603. L'électrode de référence raccordée de la même façon plonge dans le milieu extérieur. L'expérience consiste à amener la cellule d'une solution de pH 5,8 à une solution de pH inférieur (5,0) ou supérieur (6,6; 7,3; 8,0 et 9,0) en y ajoutant quelques gouttes d'HCl ou de NaOH puis de ramener la cellule dans la solution au pH initial<sup>5,8</sup>. A chaque pH, deux rapports de concentration K/Na sont testés: 0,1 mM KCl + 1 mM NaCl et 1 mM KCl + 0,1 mM NaCl; le changement de pH se fait dans la solution contenant 0,1 mM KCl.

**Résultats.** Le tableau I montre que la réponse du potentiel de membrane à une modification aller-retour du pH extérieur est d'autant mieux réversible que la cellule reste plongée dans des solutions acides.

Aux pH basiques, la réversibilité est pratiquement nulle. Par contre, la repolarisation de la cellule en fonction de la concentration externe en K est d'autant meilleure que les essais se passent à un pH supérieur ou égal à 6,6 (tableau II). Au cours du changement retour du pH, les enregistrements du potentiel de membrane ne présentent jamais de maximum (comme cela peut être le cas à l'aller<sup>4</sup>) et se distinguent souvent par l'allure monotonique de la variation (figure 1).

**Discussion et conclusion.** Les résultats du tableau II confirment que la perméabilité de *N. flexilis* au potassium est plus importante en milieu neutre ou alcalin. Comme nous l'avons démontré<sup>6</sup>, c'est essentiellement cette perméabilité accrue de la cellule au potassium qui est responsable de la variation du potentiel de membrane lorsque la cellule est plongée d'une solution à pH acide dans une autre à pH alcalin (tableau 1). Ce comportement

Tableau II. Variations du potentiel de membrane (en mV) à différents pH, lorsque la concentration en potassium de la solution extérieure est augmentée puis diminuée de 10 fois. La force ionique du milieu est maintenue constante en faisant varier d'une manière opposée la concentration en sodium. Moyenne pour 7 cellules. L'erreur standard pour chaque moyenne est comprise généralement entre 2 et 3.

pH	5,0	5,8	6,6	7,3	8,0	9,0
0,1 mM K → 1,0 mM K	+17	+36	+43	+48	+48	+46
1,0 mM K → 0,1 mM K	- 7	-29	-44	-48	-46	-45

différent de la membrane suivant le milieu peut s'interpréter en postulant l'existence de groupements négatifs ionisables au niveau de cette structure. En effet, un grand nombre de membranes cellulaires peuvent porter une forte densité de charges négatives et il est démontré que la sélectivité des membranes artificielles est influencée par leur potentiel de surface<sup>7-9</sup>. D'après les résultats obtenus, ces sites négatifs pourraient s'identifier avec des groupes carboxyles dont le pK serait de l'ordre de 5-6. Ceux-ci appartiendraient à des molécules protéïniques plutôt qu'à certains types de lipides amphotères réputés moins accessibles aux ions.

De plus, la variation du pH extérieur doit entraîner chez ces molécules, supports des sites, un remaniement structural. Par conséquent, il apparaîtra une modification de l'affinité des sites pour K<sup>+</sup> ou H<sup>+</sup> d'autant plus accentuée que les pH testés s'éloignent des conditions normales de vie de *Nitella*. Il n'est donc pas étonnant d'observer pour ces pH extrêmes une réversibilité moins bonne des phénomènes étudiés. L'allure lente et linéaire des courbes d'enregistrement du potentiel, lors du changement retour, apparaît, dans cette optique, comme la manifestation du rétablissement progressif de la structure moléculaire initiale de la membrane.

**Summary.** The better the recovering of the membrane potential of *Nitella* on restoring the initial value of the external pH after a change, the more acid is the pH of the medium (Table I). On the other hand, a better repeatability was observed in alkaline solutions (Table II) for a change in the external K<sup>+</sup> concentration. These results are interpreted as a manifestation of the binding of K<sup>+</sup> ions to ionizable fixed charges (pK about 5-6) at the membrane surface and of the control of molecular structure of the membrane by the pH.

J. LEFEBVRE et C. GILLET

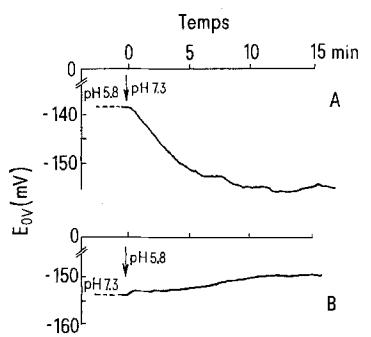


Fig. 1. Variation typique du potentiel de membrane de *Nitella flexilis* lors d'un changement aller (A) et retour (B) du pH de la solution extérieure. Les flèches indiquent le moment où le pH est modifié.

Département de Biologie végétale,  
Facultés Universitaires, 61, rue de Bruxelles,  
B-5000 Namur (Belgique), 4 juin 1973.

<sup>5</sup> C. FORSBERG, Physiologia Pl. 18, 275 (1965).

<sup>6</sup> J. LEFEBVRE and C. GILLET, J. exp. Bot., 24, (1973), à paraître.

<sup>7</sup> B. HILLE, J. gen. Physiol. 51, 221 (1968).

<sup>8</sup> S. G. A. McLAUGHLIN, G. SZABO, G. EISENMAN and S. M. CIANI, Proc. natn. Acad. Sci. 67, 1268 (1970).

<sup>9</sup> J. M. DIAMOND and E. M. WRIGHT, A. Rev. Physiol. 31, 581 (1969).