肝ブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素の誘導について

On Induction of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase in Rat Liver

(昭和 44 年 12 月 21 日 受理)

片山 (須川) 洋子** 榎 千征子* 稲垣 長 典*
(Yohko Sugawa-Katayama) (Chiseko Maki) (Choten Inagaki)

Induction of liver glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) (E. C. 1. 1. 1. 49) in adult rats was studied under various dietary conditions as follows: group 1) protein free-89% fructose diet; group 2) protein free-89% glucose diet; group 3) 20% casein-69% fructose diet; and group 4) 20% casein-69% glucose diet. Donryu strain male rats weighing about 200 g, which had been fed control diet, were starved for 2 days and then fed the above diet *ad lib*. Rat liver homogenates were centrifuged at $105,000 \times g$ for 60 minutes and G-6-P DH activity in the supernatant was measured colorimetrically. Furthermore, G-6-P DH was purified several folds in specific activity by DEAE-cellulose column chromatography, and its electrophoretical behaviour was studied. Induction of G-6-P DH in rat liver was observed in groups 3 and 4, while in groups 1 and 2, no induction was observed. The value of induction was higher in group 3 than in group 4. By polyacrylamide gel disc electrophoresis two distinct bands of G-6-P DH were observed in rats fed either fructose (group 3) or glucose (group 4) with 20% casein, but one of the two bands was obscure in rats fed protein free diet (groups 1 and 2) or in those during starvation.

代謝経路の分岐点に位置し、食餌条件やホルモンによって影響をうけやすい、いわゆる鍵酵素 (key enzyme) は代謝調節上重要な役割を果たしていると考えられている。著者らは、これら鍵酵素のうちブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PDH) [E. C. 1. 1. 1. 49] の食餌性誘導について検討してきた。

シロネズミを絶食にすると肝臓のG-6-PDHは低下し、食餌を再投与すると著しい活性の上昇がみられる^{1)~9)}ので、本報告においては食餌条件をかえることにより肝臓のG-6-PDH活性がどのように変動するかを検討した：シロネズミを絶食にしたのち、試験食を再投与して肝臓のG-6-PDH活性の変動を観察し、DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーによって酵素蛋白質を部分的に精製した。さらにポリアクリルアミドを支持体とするディスク電気泳動法によってG-6-PDHを分離し、その泳動像の相違を食餌条件のちがいの関連において比較した。

実 験 方 法

1) 供試動物

ドンリュエ系シロネズミ雄を市販の固型飼料 (オリエ

ンタル酵母K. K.) で飼育し、体重が150~250 gとなったものを用いた。実験に用いる際には、これら動物を2日間絶食にした後(水は自由に与えた)、糖質源としてフラクトースまたはグルコースを含む食餌を再投与した(第1表)。蛋白質源としてはカゼイン (20%) を用い、無蛋白食においてはカゼインを糖質でおきかえた。脂質源としては大豆油を用い、食餌中に2%含むようにした。対照シロネズミとしては固型飼料で飼育したもの(絶食にしない)を用い、試験食は1日1匹 20 g (乾燥重量) とし、水は自由に与えた。

2) G-6-PDH 活性の測定

シロネズミを撲殺後、0.1 M トリス緩衝液を用いて肝臓の10%ホモジェネートを作り、0~4°Cで $105,000 \times g$ 60分間遠心分離し、その上清を酵素源として用いた。

Table 1. Composition of diets (%)

	Protein-free diet	20% Casein diet
Fructose or Glucose	89	69
Casein	0	20
Soybean oil	2	2
Vitamin mixture	1	1
Salt mixture	4	4
Cellulose	4	4

* お茶の水女子大学家政学部栄養化学教室

** 大阪市立大学家政学部栄養生理学教室

酵素活性の測定はグルコース-6-リン酸 (G-6-P) を基質とし、NADPH の生成を自記分光光度計 (日立101型) を使用して波長 340 mμ における吸収の増大によって測定した。反応溶液は下記のとおりである。

0.1 M	トリス緩衝液 (pH 7.6)	2.4ml
0.2 M	MgCl ₂ · 7 H ₂ O	0.2
0.015 M	NADP	0.1
	酵素液	0.1
0.05 M	G-6-P	0.2

比活性は酵素蛋白質 1mg が 1 分間に生成される NADPH の mμ mole で表わした。

3) G-6-PDH の部分精製

肝重量の 2 倍相当量の緩衝液 A* を用いてホモジェネートを作り、105,000×g, 60分間遠心分離した上清から G-6-PDH を Yoshida ら¹⁰⁾¹¹⁾の方法で部分精製した。すなわち、緩衝液 A* にあらかじめ平衡にさせておいた DE AE-セルロース・カラム (1×10 cm) に肝臓の 105,000×g の上清 (5 ml) を吸着させる。完全に吸着させてから緩衝液 A* を流し、流出液の波長 280 mμ における吸収が消失し蛋白質の溶出がなくなったところで緩衝液 B** を流して黄褐色の G-6-PDH 活性画分を集めた。以上の操作はすべて 0~4°C で行なった。なお緩衝液 A* および B** の組成は次の通りである。

緩衝液 A*; 5 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4)

(メルカプトエタノール, EDTA,
NADP を終末濃度がそれぞれ 10⁻³M,
10⁻³M, 10⁻⁵M となるように含む)

緩衝液 B**; 0.1 M リン酸緩衝液 pH 5.8

(NaCl を終末濃度 0.5 M となるように含む)

4) ディスク電気泳動法

シロネズミ肝の 105,000×g 上清から Yoshida ら¹⁰⁾¹¹⁾の方法で部分精製した G-6-PDH を試料液としてポリアクリルアミドを支持体とするディスク電気泳動法を試みた。ディスク電気泳動法ではアクリルアミド濃度の異なる 2 種類のゲルを上下に組み合わせ、ガラス管 (5×70 mm) 内で重合させてゲルを作る。ゲルの調製¹²⁾は次の通りである。

①アクリルアミドゲル原液の調製

A 液: 1 N HCl 48 ml

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 36.6 g
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine) 0.46 ml

蒸留水を加えて 100ml とする (pH 8.9)

B 液: 1 N HCl 48 ml

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 5.98 g

蒸留水を加えて 100ml とする (pH 6.7)

C 液: アクリルアミド 30.0 g

ビス (N, N'-Methylenebisacrylamide) 0.8 g

K₃Fe(CN)₆ 7.0 mg

蒸留水を加えて 100ml とする

D 液: アクリルアミド 10.0 g

ビス 2.5 g

蒸留水を加えて 100 ml とする

E 液: リボフラビン 4.0 mg

蒸留水を加えて 100 ml とする

②下層 7.5%ゲルの調製

第 1 液: A 液 1 部, C 液 2 部, 蒸留水 1 部; (pH 8.9)

第 2 液: 過硫酸アンモニウム 0.14 g を蒸留水を用いて 100 ml とする。

(この液は毎週作りかえる)

下層ゲルをつくるには第 1 液と第 2 液を等量混ぜ合わせて重合させる。

③上層 3.75%ゲルの調製

B 液 1 部, D 液 2 部, E 液 1 部, 蒸留水 4 部; (pH 6.7)

上層ゲルをつくるには、この混液を光重合させる。

試料は 2 M 蔗糖溶液とともにゲルの上に重層し、上の電極槽に 0.01% ブロム・フェノール・ブルーを 1 滴加え、下側を陽極とした。ゲル 1 本あたりの電流は 2 mA とし、トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.6) を用いて泳動した。

泳動開始後、めじるしとしたブロム・フェノール・ブルーが酵素蛋白質より先に移動して青色のディスクを形成するので、これが上層ゲルと下層ゲルの界面から一定の距離 (30 mm) を移動したとき泳動をとめた。

泳動終了後、ゲルをガラス管から抜き出し、下記の G-6-PDH 用染色液に入れ、37°C で 30 分間インキュベーションして染色した。その後、ゲルを水洗し、7% 酢酸で反応をとめるとともに染色を固定した。

G-6-PDH 用染色液

1 M	トリス緩衝液 (pH 8.6)	0.6ml
0.2 M	MgCl ₂ · 7 H ₂ O	0.1
4 mM	NADP	0.1
6 mM	G-6-P	0.2
	Nitroblue tetrazorium (1.6mg/ml)	0.5
	Phenazine methosulfate (0.4 mg/ml)	0.5

実 験 結 果

1) 絶食および食餌再投与によるシロネズミ体重の変動
シロネズミを絶食にした場合およびその後食餌を再投与した場合の体重の変動を観察した (第 1 図)。絶食にする前の体重をゼロとして体重の増減をみると、2 日間の

Fig. 1. Sequential changes of body weight of rats refed diets after starvation

Group 1) rats were fed protein free-89% fructose diet

Group 2) protein free-89% glucose diet

Group 3) 20% casein-69% fructose diet

Group 4) 20% casein-69% glucose diet

絶食によって体重は 30 g 前後減少した。その後20%カゼイン食を再投与したシロネズミにおいては糖質源がフラクトースまたはグルコースどちらの場合にも体重の回復は順調に進み、再投与5日間で絶食前の体重にもどった。ところが、無蛋白食を再投与したシロネズミにおいては糖質源がフラクトースまたはグルコースどちらの場合にも体重は回復しなかった。フラクトース食とグルコース食を比較してみると、20%カゼイン食を再投与した場合には7日間の再投与では両群ほとんど同じように体重が回復していたが、14日間再投与をつづけるとグルコース食の方がフラクトース食よりも体重増加が大であった。無蛋白食を再投与した場合にはグルコース食は7日間の再投与ではほとんど体重変化がみられなかったが、フラクトース食では7日間の再投与で絶食前の体重よりもさらにわずかに減少する傾向がみられた。

2) 絶食および食餌再投与による G-6-PDH 活性の変動

体重 200 g 前後のシロネズミを2日間絶食にしたのち4種類の試験食を再投与して肝臓細胞質の G-6-PDH 活性を経時的に測定しその結果を第2表および第2図に示した。2日間絶食にすると G-6-PDH 活性は低下し、絶食前(対照シロネズミ)の約1/2の活性になった。20%カゼイン食を再投与したシロネズミにおいてはフラクトース食またはグルコース食どちらの場合にも、再投与4日間で著しく G-6-PDH 活性が上昇した。7日間の再投与以後において活性は低下の傾向を示し、14日間の再投与でフラクトース食では対照シロネズミの約3倍の活性まで低下し、グルコース食では対照シロネズミと同じレベルまで低下した。ここで糖質源がフラクトースのとき

Fig. 2. Sequential changes of liver G-6-PDH activity in rats refed diets after 2 days' starvation

C : control

Group 1~4 is as explained in Fig 1.

にはグルコースのときよりも G-6-PDH の活性上昇が顕著であり、また14日間の再投与によってもなお高い活性を示していることがとくに注目される。一方、絶食後、無蛋白食を再投与したシロネズミにおいてはフラクトース食、グルコース食どちらの場合にも対照シロネズミの活性に回復はしたが、しかし7日間再投与を続けても著しい活性変動は観察されなかった。

Table 2. G-6-PDH activity of rat liver

Control				
81 ± 15.3				
After starvation				
44 ± 5.2				
Fed after starvation	group 1	group 2	group 3	group 4
1 day	202 ± 44.2		301 ± 50.4	
2	82 ± 10.3		237 ± 50.0	
3	95 ± 26.4		308 ± 56.5	
4	91 ± 7.3	104 ± 2.5	796 ± 128.0	579 ± 52.2
5	75 ± 16.2		782 ± 81.4	
6	166 ± 22.2	66 ± 10.7	701 ± 66.5	562 ± 2.3
14			293 ± 23.4	117 ± 3.0

Values are expressed as NADPH μ moles/min. mg of protein

± : standard error of the mean

3) G-6-PDH の部分精製

シロネズミ肝の 105,000×g 上清から G-6-PDH を Yoshida らの方法¹¹⁾で部分精製した。DEAE-セルロース・カラム (1×10 cm) に肝臓の 105,000×g 上清を吸着させてから緩衝液 A*を流して、流出液の波長 280 m μ における吸収が消失したところで緩衝液 B**を流したが緩衝液 B**で溶出したときに得られるパターンを第3

Fig. 3. Elution pattern of G-6-PDH on DEAE-cellulose column

図に示した。溶出パターンはここにフラクトース食を4日間投与したシロネズミについてのみ示したが、グルコース食を同じく再投与したものでも同様のパターンが得られた。この精製法によって肝 G-6-PDH は80%回収され、部分精製して得た酵素液は 105,000×g 上清の4～6倍程度の比活性を示した(第3表)。

Table 3. Partial purification of G-6-PDH: Comparison of specific activity of liver G-6-PDH

Conditions		Before (Sup. 105,000 × g)	After partial purification
Starved		36	135
Fed after starvation			
Protein-free	Fructose (group 1)	125	558
	Glucose (group 2)	168	568
20% Casein	Fructose (group 3)	720	4102
	Glucose (group 4)	644	2856
Control		50	296

Values are expressed as NADPH mμ moles/min./mg protein.

4) ディスク電気泳動

シロネズミ肝の 105,000×g 上清を DEAE-セルローズ・カラムクロマトグラフィーによって部分的に精製したもの、このものについて、ディスク電気泳動法を試みた。第4、5図には絶食時(i)、試験食の再投与4日間(ii, iii)および対照シロネズミ(iv)のディスク電気泳動像を示した。

フラクトースを糖質源として4日間投与した場合、20%カゼイン食のシロネズミ肝の G-6-PDH には(第4図(iii)), 太いバンドと細いバンドの2本がはっきりとみられるのに対して、無蛋白食では(第4図(ii)), 細い方のバンドは不明瞭であった。絶食時および対照シロネズミにおいても(第4図(i), (iv)), 無蛋白食の場合とほとんど同じ泳動像がみられた。また、グルコースを糖質源として4日間再投与した場合にも、20%カゼイン食のときは太いバンドと細いバンドの主なる2本のバンドがはっきりとあらわれたが(第5図(iii)), 無蛋白食では

Fig. 4. Disc electrophoresis zymograms of liver G-6-PDE

condition of rats—i, starved; ii, fed protein free-fructose diet (group 1) for 4 days after starvation; iii, fed 20% casein-fructose diet (group 3) for 4 days after starvation; and iv, non-starved (control)

Fig. 5. Disc electrophoresis zymograms of liver G-6-PDE

condition of rats—i, starved; ii, fed protein free-glucose diet (group 2) for 4 days after starvation; iii, fed 20% casein-glucose diet (group 4) for 4 days after starvation; and iv, non-starved (control)

細い方のバンドが不明瞭であった〔第 5 図 (ii)〕。

無蛋白食ではシロネズミ肝における G-6-PDH 活性の誘導がみられなかったが、20% カゼイン食では活性の上昇が著しく、さらに 14 日間の再投与をつづけた場合、誘導された G-6-PDH 活性も糖質源がグルコースのときは対照のレベルまでもどるのに対して、フラクトースのときにはなお高い活性を示したので、これら G-6-PDH の活性上昇に対する糖質源のちがいを検討するためにカゼイン食 (第 3 群と第 4 群) を 14 日間再投与したシロネズミ肝についてもディスク電気泳動法を試みた (第 6 図)。その結果、再投与 4 日間のものと同じような電気泳動像を示し、フラクトースとグルコースの間には特記すべき大きな差異はみられなかった。但し、糖質源がグルコースのときにはフラクトースのときにくらべて、細い方のバンドの染色がやややすい傾向がみられた。

Fig. 6. Disc electrophoresis zymograms of liver G-6-PDH

condition of rats—i, fed 20% casein-fructose diet (group 3) for 14 days after starvation; ii, fed 20% casein-glucose diet (group 4) for 14 days after starvation

考 察

成熟シロネズミを 2 日間絶食にしたのち、無蛋白質食または 20% カゼイン食 (糖質源はフラクトースまたはグルコース) を再投与した肝臓の G-6-PDH 活性の変動を観察した。動物を絶食にすると肝 G-6-PDH 活性は絶食前の約 1/2 に低下し、そののち食餌を再投与すると、食餌中に蛋白質を含む場合にのみ、著しい活性の上昇が観察された。

絶食時の肝 G-6-PDH の活性低下は Johnson ら⁹⁾, Niemeyer ら¹⁰⁾, 弓狩ら⁹⁾ の報告とよく一致している。また絶食によって G-6-PDH 以外の種々の酵素についても活性の変動することが知られている。絶食時には、動物は外部からの食物の摂取がとだえるために生体はエネルギー源として糖質の代りに貯蔵脂肪を動員しなければならない。事実、解糖系の酵素 (グルコキナーゼ, ホスホフラクトキナーゼ, ピルビン酸キナーゼ) の活性は低下し、糖新生系の酵素 (グルコース-6-ホスファターゼ, フラクトース-1,6-ジホスファターゼ) の活性は上昇す

ることが観察されている。いいかえれば、このような酵素活性の変動は絶食という環境の変化に鋭敏に応答したものであろう。

G-6-PDH 活性と食餌中の脂肪含量について弓狩ら⁹⁾, Levielle¹⁴⁾ は食餌中に脂肪含量の多い場合に G-6-PDH 活性が低いという逆相関がみられるとし, Niemeyer ら¹⁰⁾ も絶食後高脂肪食を再投与した場合には G-6-PDH の活性上昇はみられないと報告している。高脂肪食摂取時や肝機能の障害によって糖の利用が低下している場合には脂肪酸の β -酸化が亢進する結果、血中ないし細胞内の遊離脂肪酸の濃度や肝臓のアセチル CoA 濃度が高くなって、G-6-PDH はこれらの物質によって阻害されることも考えられる。

G-6-PDH 活性と食餌中の蛋白質含量との関係について、本実験で糖質源がグルコースのときもフラクトースのときも食餌中にカゼインを含む場合だけ G-6-PDH 活性が著しく上昇し、無蛋白食の再投与では活性の上昇がみられなかった。すなわち、絶食にしたのち食餌を再投与して G-6-PDH 活性を上昇させるには食餌中の蛋白質が不可欠であることを示し、武田ら⁸⁾, Niemeyer ら¹⁵⁾ も本実験と同様の結果を報告し、また Johnson ら⁹⁾ は低蛋白食を再投与した場合にも G-6-PDH の活性上昇がおこらなかったと報告している。一方、Potter ら¹⁶⁾, Kagawa ら¹⁷⁾ は G-6-PDH の食餌性誘導は puromycin や 8-azaguanine によって阻害されると報告している。本実験ならびに Potter らの成績から G-6-PDH の食餌性誘導には酵素の de novo の合成が関与するものと考えられ、そのためには生体内に適当なアミノ酸プールが必要とされ、食餌中の蛋白質はそのアミノ酸プールを満たすのに不可欠なのであろう。

このように G-6-PDH の食餌性誘導が de novo の合成によるとすれば、生体内においては何か G-6-PDH の inducer となっているのであろうか。Weber らはインシュリンが解糖系の酵素の inducer として、また糖新生系の酵素の suppressor として働くことを系統的に研究しているが、G-6-PDH に関してインシュリンが直接作用するかどうかはまだ解明されていない。本実験において、フラクトースによってもグルコースによっても G-6-PDH の誘導はおこり、フラクトース投与の方がグルコースよりも著しい傾向がみられた (第 2 図)。このことからインシュリンが直接関与するという推論のほかにグルコース、フラクトースまたはそれらの中間代謝物質が G-6-PDH の inducer として作用していることも考えられよう。

G-6-PDH のアイソザイムについては、ヒトの赤血球¹⁸⁾, 魚¹⁹⁾, ウニの卵^{20) 21)}, ショウジョウバエ²²⁾ などで多くの

報告がなされているが、シロネズミ肝臓でのアイソザイムの存在はまだ完全には明らかにされていない。本実験で得られたディスク電気泳動像では20%カゼイン食によってもたらされたシロネズミ肝のG-6-PDH 活性上昇時において、主なる2本のバンドが検出されたが、そのうち一方のバンドは無蛋白食の再投与時、または絶食時において不明瞭であった。このことは電気泳動法にて分離されるバンドのうち、一方のG-6-PDHの酵素蛋白質が20%カゼイン食によって、その量が増大していることを示すものである。

Hori ら²³⁾²⁴⁾もシロネズミ肝のG-6-PDHはディスク電気泳動法によって数種のバンドに分れ、そのうち一つのみが性ホルモンの一つであるエストラジオールに影響されると報告している。著者らの得たディスク電気泳動像と彼らの結果とは異なるものであったが、Hori らの実験は肝臓を凍結していること、G-6-PDHの部分精製をしていないなどの実験条件のちがいによるのかも知れない。一方 DEAE-セルロースによって部分精製した De Flora ら²⁵⁾のヒトの赤血球のG-6-PDHのディスク電気泳動像と著者らの得た泳動像とは非常によく似たものであった。彼らはディスク電気泳動法で分離された夫々のバンドをさらに再泳動して、一つのバンドがやはり同じバンドとなってあらわれることも確かめているので、これらの電気泳動像が泳動中に生じた人工産物という可能性はまず少ないと考えられる。

要 約

種々の食餌条件による G-6-PDHの適応現象についてシロネズミ肝を用いて検討した。

1) シロネズミを2日間絶食にしたのち、無蛋白食あるいは20%カゼイン食(糖質源はフラクトースまたはグルコース)を再投与して、肝G-6-PDH 活性の変動を観察した。

肝G-6-PDHの活性は無蛋白食の再投与では上昇せず、食餌中に20%カゼインを含む場合にのみ活性の上昇がみられた。糖質源がフラクトースのときにはグルコースのときよりも活性の上昇が著しかった。本酵素の食餌性誘導には、糖質と蛋白質の両栄養素が不可欠であり、酵素の de novo 合成が関与するものと推察される。

2) DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーにより、肝G-6-PDHを部分精製することによって、比活性はその4~6倍に増大した。

3) 食餌性に誘導された肝G-6-PDHを部分精製したのちディスク電気泳動法によってその酵素蛋白質を分離

した。

カゼイン食の再投与時にはディスク電気泳動像として2本のバンドが明らかにあらわれるのに対し、絶食時、無蛋白食の再投与時または対照シロネズミ肝においては、その一方のバンドが不明瞭であった。この傾向は糖質源がフラクトースあるいはまたグルコースのときも同様であった。

文 献

- 1) Tepperman, J., Tepperman, H. M.: *Am. J. Physiol.*, **193**, 55 (1958)
- 2) 弓狩康三, 松田友宏, 須田正巳: 医化学シンポジウム, **4**, 43 (1964)
- 3) Willmer, J.S., Foster, T. S.: *Can. J. Biochem.*, **43**, 1375 (1965)
- 4) 弓狩康三: 蛋白質核酸酵素, **10**, 601 (1965)
- 5) McDonald, B. E., Johnson, B. C.: *J. Nutr.*, **87**, 161 (1965)
- 6) Fitch, W. M., Chaikoff, I. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 384 (1961)
- 7) Johnson, B. C., Moser, K., Sassoon, H.F.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **121**, 30 (1966)
- 8) 武田和久, 金重世利子, 小坂淳夫: 生化学, **39**, 786 (1967)
- 9) Sassoon, H. F., Watson, J., Johnson, B.C.: *J. Nutr.*, **94**, 52 (1968)
- 10) Yoshida, A.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 4966 (1966)
- 11) Yoshida, A., Steinmann, L., Harbert, P.: *Nature*, **216**, 275 (1967)
- 12) 青木幸一郎, 中埜栄三: 電気泳動法, 広川書店 p.163 (1968)
- 13) Niemeyer, H., Clark-Jurri, L., Garces, E., Vergara, F. E.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 77 (1962)
- 14) Leveille, G. A.: *J. Nutr.*, **91**, 267 (1967)
- 15) Perez, H., Clark-Jurri, L., Rabajille, E., Niemeyer, H.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2420 (1964)
- 16) Potter, V.R., Gebert, R. A., Pitot, H. C.: *Advances in Enzyme Regulation.*, **4**, 247 (1966)
- 17) Kagawa, Y., Kagawa, A., Shimazono, N.: *J. Biochem.*, **56**, 364 (1964)
- 18) Rattazzi, M.C., Bernini, L.F., Fiorelli, G., Mannucci, P.M.: *Nature*, **213**, 79 (1967)
- 19) Nakano, E., Whiteley, A.H.: *J. Exptl. Zool.*, **159**, 167 (1965)
- 20) Isono, N., Tsukada, A., Nakano, E.: *J. Fac. Sci. Uni. Tokyo Sec. IV.*, **10**, 37 (1963)
- 21) Isono, N., Tsukada, A., Nakano, E.: *ibid.*, **10**, 55 (1963)
- 22) Young, W.J., Porter, J.E., Childs, B.: *Science*, **143**, 140 (1964)
- 23) Hori, S.H., Matsui, S.: *J. Histochem. Cytochem.*, **15**, 530 (1967)
- 24) Hori, S.H., Matsui, S.: *ibid.*, **16**, 62 (1968)
- 25) De Flora, A., Larenzoni, I., Mangiarotti, M.A., Dina, D., Bonsignore, A.: *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, **31**, 501 (1968)