ゼインのペプシン消化産物より得られたペプチドによる カルモデュリンのホスホジエステラーゼ 活性促進効果の阻害

梅川 逸人*, 藤原 正也*, 古市 幸生*
高橋 孝雄*, 林 貢**, 鈴木 一正**

* 三重大学生物資源学部農芸化学教室

** サンエイ糖化株式会社

Inhibition of Accelerating Effect of Calmodulin on Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase by Peptide from Peptic Digest of Zein

Hayato UMEKAWA,* Masaya FUJIHARA,* Yukio FURUICHI,*

Takao TAKAHASHI,* Mitsugu HAYASHI** and Kazumasa SUZUKI**

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu 514

** San・Ei Sucrochemical Co., Ltd., Chita 478

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 46, 217~222 (1993)

The effect of a chloroform/methanol extract of a peptic digest of several proteins on Ca^{2+} /calmodulin-stimulated rat brain phosphodiesterase I (PDE I) was investigated. The concentration of the extract from zein producing 50% inhibition of the PDE I was 144 $\mu\text{g}/\text{ml}$. This value was 4 to 8 times lower than that for extracts of other proteins, such as ovalbumin, soy protein, and casein. The extract from zein had little or no effect on the activity of PDE I in the absence of calmodulin. These observations suggest that the extract from zein may contain some potent calmodulin-antagonistic peptide. Using an ODS column (Cosmosil C₁₈), chloroform/methanol-extracted peptides from the peptic digest of zein were separated into several fractions. The most effective fraction produced 50% inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-stimulated PDE I at 53 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and this fraction was purified to homogeneity. The sequence of the peptide was found to be AGILPLSPLF, which is identical to part of B-zein.

Key Words zein, calcium, calmodulin, phosphodiesterase.

(Received October 1, 1992)

トウモロコシ (*Zea mays* L.) は小麦、米に匹敵する生産量をもつが、大部分は飼料やデンプン工業原料となり、そのまま食用に供される量は少ない。トウモロコシのタンパク質含量は、品種によっても異なるが、高タンパク系の品種では 25% にも達し、Osborne のタンパク質分画法によると、アルブミン、グロブリン、プロラミン、グルテリンの 4 画分からなるが¹⁾、このうち 70% エタノール可溶性画分であるプロラミンはゼインとよばれ、全タンパク質の 50% 以上を占めている²⁾。しかし、これは必須アミノ酸であるリジン、トリプトファンが少ないために低栄養価とされている。

ところで食品の三次機能である生体調節を担う物質としてはタンパク質、ペプチド、糖質、脂質などさまざまな物質があるが、なかでも食品由来のタンパク質の消化産物から得られる潜在的な生理活性ペプチドが注目されている。最近、種々のタンパク質の消化産物から、生理活性物質が数多く報告されている。たとえば、カゼインよりオピオイド活性ペプチド³⁾⁴⁾、オピオイドアンタゴニストペプチド⁵⁾、アンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド⁶⁾、マクロファージ活性化ペプチド⁷⁾、血小板凝集阻害ペプチド⁸⁾ 等が、ダイズタンパク質由来では血清コレステロール低減化能をもつペプチド⁹⁾ などがある。一方、トウモロコシタンパク質ゼインからもすでにアンジオテンシン転換酵素阻害ペプチド¹⁰⁾ の報告がある。

* 〒514 津市上浜町 1515

** 〒478 知多市北浜町 24-5

cAMP や cGMP が細胞内情報伝達物質として、種々の細胞機能調節における重要性が明らかにされてきたが、環状スクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE) がその唯一の分解酵素として研究されてきた。数多く発見された本酵素のアイソザイムのうち、PDE I は細胞内カルシウム結合タンパク質であるカルモデュリンにより活性化され、機能するところから、細胞内でのカルモデュリンの標的酵素の一つとして注目されている。そこで今回、食品由来のタンパク質に潜在的に存在するカルモデュリン阻害物質を検索する目的で、疎水性の高いことを特徴とするゼインを酵素的に加水分解し、得られたペプチドのカルモデュリン阻害作用を求める方法として、 Ca^{2+} /カルモデュリン存在下の PDE I に対する影響を検討したところ、強い阻害作用を示す画分が得られ、さらにこれを精製したので以下に報告する。

実験方法

1. 材料

トウモロコシ (デント種) はサンエイ糖化(株)、オパールブミンは新鮮卵白から硫酸塩析により、3 回結晶化した標品、カゼインは関東化学(株)製、ダイズタンパク質は Fujipro®、不二製油(株)製を用いた。カルモデュリン依存性ホスホジエステラーゼ (PDE I) は Kincaid 等の方法¹¹⁾に従い、ラット脳より部分精製したものをを用いた。カルモデュリンは、牛脳より Yazawa らの方法¹²⁾に従って精製した。

2. ゼインの精製

ゼインの精製は Paulis らの方法¹³⁾に従った。すなわち、トウモロコシ全粒を冷凍粉碎し、10 倍量の冷ヘキサソールにて脱脂を行った後、風乾した。10 倍量の 0.5 M NaCl で室温にて 2 時間搅拌後、遠心分離 ($3,000 \times g$, 15 min) し、沈澱を同量の蒸留水で洗浄した。次に同沈澱を 10 倍量の 0.5% 酢酸ナトリウムを含む 70% エタノールで室温、3 時間抽出し、遠心分離 ($3,000 \times g$, 15 min) で上澄みを得た。色素を除去するため、上澄みに 20 g の活性炭を加え、2 時間搅拌後、セライトを濾過助剤として濾過し、活性炭を除去した後、濾液を蒸留水に対して透析し、凍結乾燥して精製ゼイン標品を得た。

3. PDE I 活性の測定

PDE I 活性の測定は $[\text{H}]$ cGMP (ICN Radiochemical (株)製) を基質として行った¹⁴⁾。すなわち 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mg/ml BSA, 100 μM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.4 μg /ml カルモデュリン, 0.34 μg の PDE I, 0.4 μM $[\text{H}]$ cGMP の反応液 500 μl を 30°C で 15 分間インキュベートした後、沸騰水浴中で 5 分間加熱し反応を停止させた。氷水中で冷却後、1 mg/ml snake venom (シグマ(株)製) を 50 μl 加え、再び 30°C, 10 分

間インキュベートした。反応終了後、蒸留水約 2 ml を加え、陽イオン交換樹脂 (Bio Rad 社製 AG50W-X4, 200~400 メッシュ, $0.7 \times 1.5 \text{ cm}$) カラムにかけた。生成した $[\text{H}]$ guanosine を 3 N アンモニア水 1.5 ml により溶出させ、液体シンチレーションカウンター (Beckman (株)製 LS 1801) にて放射活性を測定した。

4. 各種食品由来タンパク質の加水分解と試料溶液の調製

タンパク質には、HCl 水溶液 (pH 1.6) 中でペプシン ([EC 3.4.21.4], シグマ(株)製) を 37°C で 24 時間反応させた (酵素: 基質 = 1:50)。反応後、6 N NaOH で中和し、100°C, 3 分間の加熱により酵素を失活させ、凍結乾燥した。凍結乾燥粉末 200 mg をクロロホルム: メタノール = 2:1 に懸濁させ遠心分離 ($5,000 \times g$, 10 min) し、上清をエバポレーターで濃縮乾固した。乾固後、3 ml の 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解し、遠心分離後上清を濾過し、濾液を Spectrum 社製透析チューブ (Spectra/Pro membrane mwco=1000) を用い、蒸留水に対して透析し、試料とした。

5. ゼインのペプシン消化産物の精製

ゼイン 1 g から上記の方法で得られたペプシン消化産物を、HPLC (東ソー(株)製, コントローラー: CCPM, 検出器: UV 8000) を用い、0.1% トリフロロ酢酸 (TFA) 含有の 10% アセトニトリルで平衡化した ODS カラム (Cosmosil 5C18, 10 mm $\times$ 250 mm) にかけた。カラムを同溶媒で洗浄した後、アセトニトリルで 10~40%, 60 分間の直線濃度勾配によって、吸着物質を溶出した。溶出液は 10 分後からフラクションコレクターにより 5 分間/tube (流速: 3.5 ml/min) で分取した。得られた画分を分取した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、減圧乾固後、水に溶解し、カルモデュリン阻害活性を測定した。

6. シス-パリナリン酸による疎水度の測定

疎水度は、Kato と Nakai の方法¹⁵⁾に準じてシス-パリナリン酸を用いた蛍光法で測定した。シス-パリナリン酸は 3.6 mM シス-パリナリン酸エタノール溶液を調整した。なお、酸化防止剤として 3.6 mM BHT (butylated hydroxytoluene) を添加した。試料溶液のタンパク質濃度が 0.025% から 0.050% になるように段階的に希釈した溶液を調製、試料液 1 ml に対してシス-パリナリン酸溶液 10 μl を加え蛍光強度を蛍光分光光度計 (日立 650-60 型) により、スリット幅を 5 nm とし 25°C で測定した。また、励起波長は 325 nm, 測定波長は 425 nm とした。タンパク質濃度 1% における蛍光強度 S_0 を回帰計算により計算し、 S_0 を相対疎水度とした。

7. アミノ酸配列の決定

ゼインのペプシン消化産物から得られたペプチドの最終標品を気相式自動アミノ酸シーケンサー (Model 473A, Applied Biosystems 製) にかけてアミノ酸の一次構造を決定した。

8. アミノ酸分析

試料を 6N 塩酸により、真空封管中で、24 時間塩酸加水分解 (110°C) してアミノ酸分析に供した。分析は日立高速液体クロマトグラフ (655/655A 型) によりニンヒドリン法で行った。

9. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、牛血清アルブミンを標準物質として Lowry らの方法¹⁶⁾に従った。

実験結果と考察

1. 各種食品由来タンパク質加水分解物の PDE I 活性に対する影響

カゼイン、オボアルブミン、ダイズタンパク質、ゼインをペプシンにて 37°C, 24 h 消化後、加水分解物の凍結乾燥粉末よりクロロホルム/メタノール抽出した画分について Ca^{2+} /カルモデュリン存在下の PDE I 活性に対する影響を測定し、阻害作用の強度を IC_{50} (PDE I 活性を 50% 阻害するのに必要とされるタンパク質量) として Table 1 に示した。ゼインの加水分解物の Ca^{2+} /カルモデュリン存在下の PDE I 活性に対する阻害作用は、カゼインやオボアルブミンなどの消化物に対して 4~8 倍強い値であった。またゼインの加水分解物のクロロホルム/メタノール抽出画分の阻害作用がカルモデュリンに対するものか、または PDE I 自体に対するものかを検討するため、 Ca^{2+} /カルモデュリン存在下と非存在下の PDE I 活性について検討した。Fig.1 に示した濃度の範囲では、ゼインの加水分解物は Ca^{2+} /カルモデュリン非存在下には強い阻害活性は認められず、 Ca^{2+} /カルモデュリン存在下 PDE I に対してのみ濃度依存的にその活性を阻害した。このことからゼイン分解産物による酵素活性の阻害は PDE I 自体に対するものではなく、カルモデュリンに対する阻害作用であることが推定された。またこの阻害作用はカルモデュリンの過剰添加により消失した (結果は示していない)。さらに、これら 4 種類タンパク質のペプシン消化産物のクロロホルム/メタノール抽出画分の疎水性を求め、その結果を Table 1 に併せて示した。 S_0 値が大きいものほど、疎水性が高いこととされているが、ゼインのペプシン消化産物のクロロホルム/メタノール抽出画分はオボアルブミンから得られた画分よりは疎水性は高かったものの、ダイズタンパク質やカゼインから得られた画分よりは疎水性は低かった。一般にカルモデュリンの生理活性の発現にはそ

Table 1. Characterization of chloroform/methanol extract of a peptic digest of various protein.

Protein	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^{a)}	Hydrophobicity (S_0) ^{b)}
Ovalbumin	850	58
Soy protein	630	650
Casein	1040	165
Zein	144	124

a) The concentration of the extract to cause 50% inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-stimulated rat brain PDE I activity. b) Hydrophobicity (S_0) of the extract was defined by the method of Kato and Nakai.¹⁵⁾

Fig. 1. Effect of chloroform/methanol extract of a peptic digest of zein on PDE I activity.

PDE I activity was measured in the absence (○) and presence (●) of 0.4 $\mu\text{g/ml}$ calmodulin along with varied amount of chloroform/methanol extract of a peptic digest of zein.

の疎水性が重要であることが知られている¹⁷⁾。W-7 (N-(6-aminoethyl) 5-chloro-1-naphthalenesulfonamide) などのナフタレンスルホンアミド系のカルモデュリン阻害剤は、メチレン鎖は長くするほど、すなわち疎水性を上昇させるほどカルモデュリンに対する親和性は高まるが¹⁸⁾、このことはアルキルアミンをリガンドとしたクロマトグラフィーでも証明されている¹⁹⁾。しかしながら今回、これら 4 種類のタンパク質のペプシンによる分解産物では疎水性の高さと Ca^{2+} /カルモデュリン存在下の PDE I に対する IC_{50} との間には相関性がみられなかった。このことは異なるタンパク質の酵素分解によって生じたペプチド間などにおいては、必ずしもその一次構造に類似性がみられるとは限らないので、疎水性と PDE I に対する IC_{50} との間に相関性がみられなかったものと考えられる。

2. ゼイン由来のカルモデュリン阻害ペプチドの精製

ゼインのペプシン消化産物が比較的カルモデュリンに対する親和性が高い点から、これを精製することを試みた。ゼイン 1g のペプシン消化産物をクロロホルム：メタノール (2:1) に懸濁させ、一夜放置後、遠心分離 (10,000×g, 20 min) し、得られた上清を乾固させ、蒸留水 6 ml に溶解した後、蒸留水に対して透析し、濾過後、0.1% TFA を含む 10% アセトニトリルで平衡化した ODS カラム (Cosmosil 5C₁₈, 10 mm×250 mm) に供した。0.1% TFA を含む 10% アセトニトリルでカラムを洗浄し、225 nm における吸光度がベースラインまで下がったのを確認後、アセトニトリル、10~40%, 60 分間の直線濃度勾配にて溶出した。Fig. 2 にその溶出結果を示す。なお溶出液は 10 分後からフラクションコレクターにより 17.5 ml/tube (5 min/tube) で分取した。同様な操作を数回繰り返し、各画分を収集した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。乾燥物を少量の水に溶解し、Ca²⁺/カルモデュリン活性化 PDE I に対する影響を検討した。分画されたペプチドの濃度 100 µg/ml の際の PDE I に対する阻害効果を PDE I の残存活性で表し、Fig. 2 に併せて示した。図に示すように Fraction No. 9 および 10 に強い阻害活性が認められ、最も強い阻害活性を示した Fraction No. 10 の Ca²⁺/カルモデュリン存在下の PDE I に対する IC₅₀ は 53 µg/ml であった。またこの阻害作用はカルモデュリンの過剰添加により回復した (結果は示していない)。各精製段階における Ca²⁺/カルモデュリン存在下の PDE I に対する IC₅₀ を Table 2 に示した。Fraction No. 10 はペプシン処理を行ったゼインに比して IC₅₀ が約 10 倍上昇した。そこでこの強い阻害活性を示す画分を FI とし、ODS (Cosmosil 5C₁₈-AR, 4.6×150 mm) および CN (Cosmosil 5CN-R, 4.6×150 mm) の 2 種類の逆相カラムを用い、HPLC にて純度の検定を行った。双方のカラムともに 0.1% TFA を含む 20% アセトニトリル中にて FI 画分を吸着させ、アセトニトリル 20~45% の濃度勾配、流速 1 ml/min で溶出した。Fig. 3 に示すように、双方のカラムから、単一のピークとして溶出した。

3. FI の一次構造

ゼインは溶解性、アミノ酸組成、電気的性質、免疫学的性質、クロマトグラフィーなどの挙動の相違から α, β, γ の三つの異なった画分に分けられることが知られている²⁰⁾²¹⁾。α-ゼインは、全ゼインの 75~85% を構成しており、分子量 (M_r) 21,000~25,000 のポリペプチドと少量の M_r 10,000 のポリペプチドからなる。β-ゼインは M_r 17,000~18,000 のメチオニンに富んだポリペプチドからなり、全ゼインの 10~15% を構成してい

Table 2. Purification of peptide which suppresses Ca²⁺/calmodulin-stimulated rat brain PDE I.

Purification step	IC ₅₀ (µg/ml) ^{a)}
Pepsin-treated zein	513
Chloroform/methanol extract	144
Fraction No. 10	53

^{a)} The concentration which produces 50% inhibition of Ca²⁺/calmodulin-stimulated rat brain PDE I activity.

Fig. 2. Fractionation of chloroform/methanol extract of a peptic digest of zein on an ODS column (Cosmosil 5C₁₈, 10 mm×250 mm), and effect of each fraction on Ca²⁺/calmodulin-stimulated PDE I activity.

PDE I activity (●) was measured in the presence of 0.4 µg/ml calmodulin and 100 µg/ml of each fraction.

る。γ-ゼインは M_r 27,000 のプロリンに富んだポリペプチドで、全ゼインの 5~10% を構成している。今回、トウモロコシより精製したゼインには β, γ タイプのものはほとんどみられず、α タイプのみであったが (結果は示していない)、FI が α-ゼイン由来のものであるかどうかを検討するため、FI のアミノ酸配列を決定することを試みた。気相式シーケンサーによりエドマン分解にて一次構造を解析すると FI は AGILPLSPLF であった。さらに FI のアミノ酸分析を行いその結果を Table 3 に示した。アミノ酸分析によるアミノ酸組成とシーケンサーの結果は一致し、FI は分子量 912 のデカペプチドと判明した。ゼイン 1g から最終的に 5.0 mg の FI が得られた。これはゼイン総量の 0.5% に相当した。ゼインの一次構造から FI の一次構造と一致する部分を探索すると、FI には α-ゼインのうち Bゼインの

Fig. 3. ODS (A) and CN (B) column chromatographies of FI.

FI (fraction No. 10 from the first ODS column chromatography) was applied to two types of reverse phase column, i.e., ODS (Cosmosil 5C₁₈, 4.6×150 mm) and CN (Cosmosil 5CN-R, 4.6×150 mm) column, with 20% acetonitrile in 0.1% TFA and eluted with a linear gradient of acetonitrile (20–45%) in 0.1% TFA.

Table 3. Amino acid composition of FI.

Amino acid	FI	
	mol/mol	integer
Ser	1.08	1
Pro	2.29	2
Gly	0.88	1
Ala	0.88	1
Ile	0.93	1
Leu	2.81	3
Phe	1.00	1
Total		10
Molecular weight		912

一次構造と一致する部分が認められた。現在までにBゼインの一次構造は8種類決められており^{22)~25)} そのうち4種類の一次構造とFIのシーケンスは一致した。すなわち Marks らの決定した2種類の一次構造のN末端

の64~73番目と61~70番目²²⁾, Pedersen らの64~73番目²³⁾, Geraghty らの64~73番目²⁴⁾と一致した。

一般にタンパク質は生体内の消化管において消化酵素によってアミノ酸レベルまで分解され、吸収されるが、オリゴペプチドの状態で吸収されるものも多いとされている²⁶⁾。トウモロコシタンパク質ゼインも実際に消化管内でアミノ酸とさまざまなペプチドに分解され、本研究で見いだされたようなカルモデュリン阻害効果のあるものも生ずることが推察される。このようなペプチドの生体内での機能の発現については今後の課題となるが、カルモデュリンとの親和性をもつ点で生体内で重要な役割を演じていることが示唆される。

要 約

食品由来のタンパク質消化産物から、食品の三次機能である生体機能を担う物質を検索する目的で、ゼイン、ダイズタンパク質、カゼイン、オボアルブミンをペプシンにて消化し、消化物のクロロホルム/メタノール抽出画分についてカルモデュリン依存性環状スクレオチドホスホジエステラーゼ (PDE I) に対する影響について検討した。ゼインのペプシン消化産物は Ca^{2+} /カルモデュリン存在下に PDE I を低濃度で阻害し、他のタンパク質から得られた消化産物より 4~8 倍の強力な阻害活性を示した。そこで、ゼインから得られた画分を ODS カラムを用いて精製したところ、PDE I に対する阻害作用が IC_{50} が $53 \mu\text{g/ml}$ と非常に阻害活性の強い画分が得られた。この画分を ODS カラムでさらに精製し、得られた画分のアミノ酸の一次構造の解析を行ったところ、AGILPLSPLF なる構造を示すデカペプチドであることが判明した。

文 献

- 1) Wilson, C.M.: Corn: Chemistry and Technology (Watson, S.A. and Ramstad, P.E., eds.), 273 (1987), American Association of Cereal Chemists, Inc. (St. Paul)
- 2) Wilson, C.M.: Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive Value (Gottschalk, W. and Müller, H.P., eds.), 271 (1983), Nijhoff, M./Junk, W. Publishers (The Hague)
- 3) Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A. and Lottspeich, F.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1211 (1979)
- 4) Henschen, A., Lottspeich, F., Brantl, V. and Teschemacher, H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **360**, 1217 (1979)
- 5) Yosikawa, M., Tani, F., Ashikaga, Y., Yoshimura, T. and Chiba, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2951 (1986)
- 6) Maruyama, S. and Suzuki, H.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393 (1982)
- 7) Parker, F., Samour, D.M., Flioch, F., Zerial, A., Werner, G.H., Jolles, J., Casaretto, A.,

- Zahn, H. and Jolles, P. : *Eur. J. Biochem.*, **145**, 677 (1984)
- 8) Jolles, P., Toledano, S.L., Dunn, F.W. and Caen, J.P. : *Eur. J. Biochem.*, **158**, 379 (1986)
 - 9) Yashiro, A., Oda, S. and Sugano, M. : *J. Nutr.*, **115**, 1327 (1985)
 - 10) Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1313 (1991)
 - 11) Kincaid, R.L., Manganiello, V.C. and Vaughan, M. : *J. Biol. Chem.*, **257**, 10638 (1981)
 - 12) Yazawa, M., Sakuma, M. and Yagi, K. : *J. Biochem.*, **87**, 1313 (1980)
 - 13) Paulis, J.W., James, C. and Wall, J.S. : *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 1301 (1969)
 - 14) Umekawa, H., Tamiya, T., Fruichi, Y., Takahashi, T. and Tanaka, T. : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2641 (1990)
 - 15) Kato, A. and Nakai, S. : *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 13 (1980)
 - 16) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
 - 17) Tanaka, T. and Hidaka, H. : *J. Biol. Chem.*, **255**, 11078 (1980)
 - 18) Hidaka, H. and Tanaka, T. : *Methods in Enzymology* (Means, A.R. and O'Malley, B.W., eds.), **185** (1983), Academic Press (New York)
 - 19) Tanaka, T., Umekawa, H., Ohmura, T. and Hidaka, H. : *Biochim. Biophys. Acta*, **787**, 158 (1984)
 - 20) Esen, A. : *Plant Physiol.*, **80**, 623 (1986)
 - 21) Esen, A. : *J. Cereal Sci.*, **5**, 117 (1987)
 - 22) Marks, M.D., Lindell, J.S. and Larkins, B.A. : *J. Biol. Chem.*, **260**, 16451 (1985)
 - 23) Pedersen, K., Devereux, J., Willson, D.R., Sheldon, E. and Larkins, B.A. : *Cell*, **29**, 1015 (1982)
 - 24) Geraghty, D., Peifer, M.A., Rubenstein, I. and Massing, J. : *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5163 (1981)
 - 25) Geraghty, D.E., Messing, J. and Rubenstein, I. : *EMBO J.*, **1**, 1392 (1982)
 - 26) Gimble, G.K., Rees, R.G., Keohane, P.P., Gartwright, T., Desreumaux, M. and Silk, B.A. : *Gastroenterology*, **92**, 136 (1987)

(1992 年 10 月 1 日受理)