家蚕消化液ヌクレアーゼの作用様式と oligonucleotide の 塩基順列決定への利用

添田栄一*, 向井純一郎, 武谷立子, 阿久根了
(九州大学農学部農芸化学教室, *佐賀大学農学部農芸化学教室)

昭和 42 年 7 月 3 日 受理

Mode of Action of a Silkworm Nuclease and an Analysis of Oligonucleotide

By Eiichi SOEDA*, Jun-Ichiro MUKAI, Ryuko TAKEYA and Satoru AKUNE
*Kyushu University; *Saga University*

(1) Model experiments were done to determine the structure of larger oligonucleotides, using a silkworm nuclease and RNase-I digests. When penta-, hexa- and heptanucleotides isolated from RNase-I digests were degraded by the nuclease, followed by the column chromatography on DEAE-cellulose in the presence of 7 M urea, the redigests gave six peaks according to the net negative charges. Peaks bearing -1 and -2 charges consisted mostly of NpN and NpNpN, respectively, coming from the 5'-termini of the original chains. On the other hand, peaks bearing -5 and -6 charges were predominantly pNpN and pNpNpN, respectively, coming from the 3'-termini. Thus, the sequence of three successive bases at both ends could be determined by the subsequent alkaline hydrolysis and paper chromatography. Peaks bearing -3 and -4 charges were pNpN, and pNpNpN and pNp. Of all these, since pNpN and pNpNpN came from inside of the chains, the base sequence at the internal positions could be determined if these fragments were identified with alkaline treatment or with a direct paper chromatography without alkaline treatment.

This method may be applied not only to the structural analysis of an oligonucleotide but also to the determination of the three successive base sequences from the 5'-terminus of a polynucleotide.

(2) Initial attack on pentanucleotides by the nuclease is chiefly at either of the following two positions.

(Received July 3, 1967)

緒 言

1965 年, Holley ら⁽¹⁾により酵母のアラニン t-RNA の一次構造が決定されて以来, Madison ら⁽²⁾によりチロシン t-RNA, Zachau ら⁽³⁾によりセリン t-RNA も決定され, その後続々と t-RNA の一次構造決定が試みられていく。これらの意味で Holley らの仕事は, 蛋白質化学における Sanger ら⁽⁴⁾のインシュリンの一次構造決定に匹敵するものと思われる。

核酸の一次構造決定における最大の障害は, 核酸を構成するヌクレオシド残基の種類が少ないことで, このことが蛋白質よりも分析を困難にしている。しかし, 核酸はヌクレオシドがホスホジエステルで互に結ばれてお

り, どちら側のエステル結合を切断するかにより, たとえば, 一つのヌクレオシドでも, 磷酸基の結合状態により 4 つの種類, すなわち, pNp, Np, pN, N** が存在することになり, したがって oligonucleotide に関しては, ペプチドよりも分析が簡単になる可能性もある。現在, RNA の構造決定に最もよく用いられる酵素は, ウン片臓の RNase-I^(5,6), および *Aspergillus oryzae* の RNase-

** 大文字 N はヌクレオシド, 小文字 p は糖とエステル化した磷酸基を表わす。そして N の左側に書かれた p は糖の 5'-OH 基と, 右側の p は 3'-(または 2'-) OH 基と結合した磷酸基を示す。なお N の右の番号は 5' 末端からのヌクレオシドの順である。

T_1 ⁽⁷⁾ であり, これらによる分解生成物のうち mono-~trinucleotide は濾紙電気泳動などの方法^(8,9)により比較的容易に分析できるが, tetranucleotide 以上の高分子の分析は簡単でなく, *Micrococcus pyogenes* のヌクレアーゼ⁽¹⁰⁾ や蛇毒のホスホジエステラーゼの使用⁽¹¹⁾ などが考案されている。

筆者ら^(12,13)は, oligonucleotide 分析の一方法として, 家蚕消化液ヌクレアーゼを使用することを考え, モデル実験として RNase-I による酵母 RNA の分解物より tetra- および pentanucleotide を取り出し, これらを基質として蚕消化液ヌクレアーゼを作用させ, 7 M 尿素 DEAE-セルロースカラムにより分解物を分画し, さらにアルカリ分解, 濾紙クロマトグラフィーを併用することにより, 従来の方法よりも簡単に塩基順列を決定しうることを明らかにした。つまり tetranucleotide の場合, 次のごとくなる。

本報告では, 酵素の作用様式を調べ, また, この方法がどの程度の oligonucleotide の分析に適するかを検討した。

材料および方法

酵素: 酵素の精製, ならびに酵素単位は既報^(14,15)に基づく。精製標品はホスホジエステラーゼ, ホスホモノエステラーゼ活性を持たない。

基質: Crestfield らの方法⁽¹⁶⁾に従ってパン酵母より調製された高分子 RNA 290 mg とウシ脾臓 RNase-I (Worthington 社製) 7 mg を 20 ml の水に溶かし, 37°C に保温する。この間, 反応液はカセイソーダで pH 7 に調節する。24 時間後反応液をセロファンチューブ (32/36) に入れ, 水に対して透析することにより低分子の生成物 (主に mono- と dinucleotide) を除く。透析内液に 40 g の尿素を加え, 水で全量 100 ml にし, 0.005 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.6)-7 M 尿素で十分に平衡化させた DEAE-セルロースカラム (0.8×110 cm) に吸着させる。次に水平に置かれた同型の 2 つの容器の一方に 0.005 M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.6)-7 M 尿素 1.5 l を, 他方はさらに 0.3 M NaCl を含む同液 1.5 l を入れ, サイフ

Fig. 1. Chromatography of RNase-I Digest of Yeast RNA.

RNase-I digest (290 mg) were first dialysed against water to remove low-molecular weight nucleotides, and then applied on a DEAE-cellulose column (0.8×110 cm) equilibrated with 0.005 M Tris-Cl, pH 7.8, -7 M urea and then subjected to a linear gradient of NaCl, from 0 to 0.3 M, total volume 3 l, both solutions containing the equilibration solution. The number in the peak represents the degree of polymerization of nucleotide.

オンで連結させ, 直線状に塩濃度を上げながら 20~30 ml/hr で流し, カラムから酵素分解物を重合度別⁽¹⁷⁾に溶出させ, 溶出液の $OD_{270\text{m}\mu}$ を測定する。そのクロマトグラムを Fig. 1 に示す。次に各ピークを構成するフラクションを集め, 水で約 5 倍に希釈し, Tomlinson らの方法⁽¹⁷⁾に従って 0.02 M 重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.4) で平衡化させた DEAE-セルロースカラムに吸着させ, Cl^- がなくなるまで同液で十分に洗い, 脱塩, 脱尿素を行なう。次いで吸着したヌクレオチドは 2 M 重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.4) で溶出させ, 溶出液は乾燥するまで 40°C で減圧濃縮する。そしてこれに水を加え, 再び減圧濃縮する。この操作を 3~4 回繰り返すことにより重炭酸塩は除かれる。このようにして調製されたヌクレオチドは -20°C で保存する。

酵素分解: 既報^(13,14)のごとく, 0.04 M 炭酸ソーダ緩衝液 (pH 10.5), 0.5 mM Mg^{2+} , 20 $OD_{270\text{m}\mu}$ 単位*の基質につき 2300 酵素単位のヌクレアーゼからなる全量 0.15~0.20 ml の酵素反応液を 37°C に保つ。1 時間後 5 ml の 7 M 尿素-0.02 M 酢酸ソーダ (pH 7.5) を加える。

* $OD_{270\text{m}\mu}$ 単位: 水溶液 1 ml を, 幅 1 cm の石英セルを用い 270 $m\mu$ を測定したとき, 読みが 1 であるときに 1 $OD_{270\text{m}\mu}$ 単位とする。

酵素分解物の分別と分析： 反応液は直ちに 0.02 M 酢酸ソーダ-7 M 尿素で平衡化させた DEAE-セルロースカラム (0.4×35 cm) に吸着させる。次に、前述のごとく、2 個の同型の容器の一方に 0.02 M 酢酸ソーダ-7 M 尿素 100 ml, 他方に 0.4 M 酢酸ソーダ-7 M 尿素を入れ、直線状に濃度勾配を上げながら、吸着されたヌクレオチドをその分子当りの磷酸解離基の数別に分ける。各ピークは、前述のごとく脱塩、脱尿素を行なう。ただし、DEAD-セルロースによる脱塩法においては、NpN, NpNpN, pN, および Np の回収率が悪く、これらに対しては活性炭を用いて脱塩、濃縮⁽¹⁸⁾を行なう。

このようにして得られたヌクレオチドを、0.5 N KOH で 37°C, 18 時間分解し、過塩素酸で中和した後に、濾紙にスポットし、続いて、一次元に 95% エタノール：1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 5.0 (75 : 30), 二次元に 0.5 M アンモニア水で pH 3.8 に調節したイソ酪酸* を用い、下降法でペーパークロマトグラフィーを行なう⁽¹⁹⁾。また、5'-mononucleotide と 3'-(2'-)mononucleotide の分離には、一次元に 95% エタノール：2% (w/v) 硼酸：アンモニア水 (7 : 2 : 1)⁽²⁰⁾を用いる。

分離したスポットは、同時につけたマーカーの *R_f* 値との比較、および 0.01 M HCl で溶出後、250/260 *mμ*, 280/260 *mμ*, 290/260 *mμ* の比により同定した。

結果および考察

Pentanucleotide の分解様式

すでに報告^(12,13)したように、pentanucleotide 分解の

* イソ酪酸はロットにより、pNp の *R_f* 値が小さく、分離が悪いことがあり、この場合は pH を 3.9~4.0 に上げると pNp の分離がよくなる。

Fig. 2. Relative Amounts of the Fragments Derived from the Digestion Products of Pentanucleotides with 820 and 2300 Enzyme Units.

The nuclease digestion products of pentanucleotides were separated by DEAE-cellulose column in the presence of 7 M urea. Elution pattern of digestion products with 2300 enzyme units is shown in Fig. 3 (a). Each peak was characterized as described in Table I.

Percentage of each fragment was calculated against the sum of fragments recovered from the column.

第一段階は次の 3 通りである。

これら 3 つの反応の割合をみるため、酵素濃度を変え、分解させたときの各生成物の割合の比較を Fig. 2 に示す。ここで NpN, NpNpN, および pNpNp の割合が、酵素量を変化させたにもかかわらず一定であることは、これらがいずれも酵素に対して resistant であることと同時に、NpNpN と pNpNp は専ら (b) の反応により生

Table I. Analysis of the Fragments obtained from the Nuclease Digest of Pentanucleotides

	pGp	pAp	pCp	pUp	Gp	Ap	Cp	Up	pG	pA	G	A	Ratio	Identity of peak
P-1					1.9	1.9 ^{a)}					1.2	2.3	Np/N=1.1	NpN
P-2					1.2	1.4			0.2	0.1	0.3	0.4	Np/N=3.7	NpNpN, pN, Np ^{b)}
P-3	0.6	2.7			0.3	0.2					0.8	1.6	pNp/N=1.5	pNpN, NpNp
P-4			1.5	1.1	0.2	0.3	0.1	0.1						pNp, NpNpNp
P-5	0.7	0.5					0.6	0.7					Np/pNp=1.1	pNpNp
P-6	0.3	0.1			0.3	0.2	0.3	0.1					Np/pNp=2.2	pNpNpNp

Oligonucleotide fractions derived from several column chromatographies, of which typical elution pattern is shown in Fig. 3 (a), were desalted with DEAE-cellulose or charcoal and then treated with alkali. After neutralization, aliquots of the alkaline hydrolysate were subjected to paper chromatography. The separated UV absorbing compounds were cut, eluted with water and the absorbancy at 270 *mμ* was read.

a) 1.0 OD_{270mμ} unit is defined as the amount of material giving an absorbance reading 1.0 at 270 *mμ* when dissolved in 1 ml and a light path 1 cm.

b) (Np)_nNp type was come from non-enzymic degradation during preparation of the substrate and expressed as the control in Fig. 3.

Fig. 3. Separation of the Nuclease Digest of (a) Penta-, (b) Hexa-, and (c) Heptanucleotides Prepared from RNase-I Digest.

The exhaustive digests of each isoplithic oligonucleotide with the nuclease were applied on a DEAE-cellulose column (0.4×37 cm) equilibrated with 0.02 M sodium acetate, pH 7.5, 7 M urea, and subjected to a linear gradient of sodium acetate, pH 7.5 from 0.02 to 0.4 M, total volume 200 ml, both solutions containing 7 M urea. The dotted line represents control.

じ、しかも反応初期に生成されたことを示す。一方、NpN も一定の割合を保っているが、これは④と⑤による生成物 NpNpNpN がさらに分解し、NpN と pNpN に

なったものが考えられる (NpNpNpN→NpNpN+pN) は十分に検討した結果、mononucleotide としては脱塩中の非酵素的分解による Np のみで、酵素生成物の pN は存在しなく、したがってこの反応は起こらない)。なお、反応⑥は、生成物 NpNpNpN がやや分解されにくい⁽²¹⁾にもかかわらず、わずかしき認められなかったことから、割合的には少ないものと思われる。他方 tetranucleotide の場合、3'-phosphomonoester に続く phosphodiester の分解は、さらに内部の phosphodiester の分解の 2/9 である^(12,13)。以上のことから、反応④と反応⑥とを比べると④が大部分であり、まず NpN と pNpNpNp が生じ、その後、徐々に pNpNpNp が pNp と pNpN になったと考えるのが妥当である。そして pNpNpNp と NpNpN は同じ trinucleotide でも、前者は分解されるが後者は分解されないことは、この酵素反応の susceptibility に磷酸基が関与していることを示す⁽²¹⁾。

Penta-~heptanucleotide の分析

これらのヌクレアーゼによる分解物の溶出曲線を Fig. 3 に示す。各ピークは主に磷酸基による negative charge により分離したものであり、図のように P-1, P-2, …… P-6 と符号をうつ。本酵素が oligonucleotide に対し base preferency がない⁽²²⁾ことより、penta-nucleotide 以上の oligonucleotide の分解では、常にこのような溶出曲線になるものと思われる。

Pentanucleotide (N₁pN₂pN₃pN₄pN₅) の場合、各ピークを構成するヌクレオチドの構造決定は、溶出の位置により磷酸解離基の数、ならびに Table I に示されたように、脱塩、アルカリ分解、ペーパークロマトグラフィーを用い決定された。Table 中には理想値より高いが 3'-

Table II. Summary of Analysis of Peak from Chromatography of the Nuclease Digestion Products on DEAE-Cellulose Column

	Oligonucleotide	Tetra-	Penta-	Hexa-	Hepta-
P-1	NpN	6.5	7.3	8.5	5.3
P-2	{ NpNpN	1.7	3.0	5.0	5.7
	{ pN	—	0.3	0.3	0.4
	{ Np	0.2	0.3	0.2	0.3
P-3	{ pNpN	—	5.7	7.5	8.6
	{ NpNp	0.7	0.6	0.3	3.4
P-4	{ pNpNpN	—	—	trace	4.6
	{ pNp	0.7	2.6	0.4	1.6
	{ NpNpNp	0.4	0.9	1.0	2.4
P-5	pNpNp	4.8	2.5	2.7	2.7
P-6	pNpNpNp	—	1.4	2.6	1.5

Each fragment was determined by the same method as described in Table I.

mononucleotide がみられる, これは Fig. 3 の control に表わされているように非酵素的分解により生じたものである. Table II は同様にして決定された tetra~heptanucleotide の分解物の値を示す. tetranucleotide はすでに報告⁽¹²⁾されているが比較の意味で列挙する.

さて, pentanucleotide の分解物, NpN, NpNpN, pNpN, pNp, pNpNp, pNpNpNp が元のどの部分に相当するかは分解物にヌクレオシドが存在しないことや, 磷酸基を考慮すれば次のようになる.

そして, 上述のアルカリ処理は, これらの分解物の塩基順列を磷酸基とヌクレオシドの位置から決定できる. すなわち,

したがって, これらの oligonucleotide を組み合わせることにより元の penta-nucleotide の全塩基順列を決定することができる. すなわち, P-1 と P-5 を分析することにより, 両末端からそれぞれ 2 個ずつの塩基順列がわかり, また P-2, P-6 のアルカリ分解物は, 両末端から 1, 2 番目の塩基はともに Np で示されるが, 3 番目のものは, 5' 末端の方は N, 3' 末端は pNp として表わされる. したがって P-1 と P-2, P-5 と P-6 とを組み合わせることにより, 両末端からそれぞれ 3 個の塩基順列が確実にわかり, これらのことは pentanucleotide 以上の oligonucleotide について共通である. なお, P-2 は少量の pN を含んでいるが, アルカリ分解後, ペーパークロマトグラフィーを行なえば, pN と NpNpN の分解物の一部である Np とは分離するので, pN は NpNpN の分析の妨げとはならない. いずれにせよ, P-1, P-2, P-5, P-6 の分析により pentanucleotide の塩基順列は解明するわけであるが, さらに P-3 の分析により内部塩基の並びが誤らないことを確認することができる.

Hexanucleotide (Fig. 3-b) の場合, P-1, P-2 および P-5, P-6 の分析により, 前と同様に両末端から 3 個ずつの塩基順列がわかるので, これだけで hexanucleotide

の 6 つの塩基の並びは決定するが, さらに残りの P-3, P-4 は, hexanucleotide の次のヌクレオチド残基からくるものである.

P-3 の場合, 2 つの区分が重複しており, これらも, やはりアルカリ分解することにより pN₃p, pN₄, pN₄p, N₅ となり, N₃~N₅ の順序は決定する. 一方, P-4 は pNp と pNpNpN を含むが, そのうち, 後者は量的には少なかった.

Heptanucleotide (Fig. 3-c) も同様に, 両末端から 3 個ずつの塩基順列はわかるが, これだけでは不完全であり, とくに分析する oligonucleotide の重合度が増すに従い, 内部鎖からくる P-3, P-4 の部分が增大するが, この場合, アルカリ分解はせずに, 直接濾紙電気泳動やペーパークロマトグラフィーを用い分離, 定量すれば, さらに高級な oligonucleotide の分析も可能である. たとえば heptanucleotide の場合, P-3 と P-4 は次のように N₃ から N₇ におよぶ fragment から構成され, この fragment を分離, 同定し, 互に重ね合わせることで内部鎖の塩基順列も決定することができる.

なお, P-4 は 2 つの山に分かれているが, この場合, pNp, pNpNpN, NpNpNp の 3 つの型が混在し, それらの持つ第一, 第二磷酸基の negativity の差により生じたものと思われる. 分析の結果, 前のピークはほとんど pNp であった.

このように, 本法ではさらに分子量の大きい oligonucleotide の分析も可能であるが, この場合, 他のいかなる方法でもいえることだが, 分析する oligonucleotide が分解していないことが必要である. Table I で Np, NpNp, NpNpNp は非酵素的分解物であり, この原因として, 酵素反応中におけるアルカリ分解と脱塩中の分解とが考えられ, NpNpNp についてこのことを検討した. すなわち, 酵素液の代わりに水を用いる以外は, 酵素反応と同一条件でインキュベートした NpNpNp と, 脱塩後の NpNpNp そのままをそれぞれ上述の系でカラムクロマトグラフィーを行なったところ, その溶出曲線は同一であったが, NpNpNp のピーク以外にその分解物で

ある NpNp および Np に相当するピークがみられ, このことから非酵素的分解物は脱塩中におこったものと判断した. 脱塩中の分解については, Bell ら⁽²³⁾ も同様のことを述べている.

以上のごとく, 本法は oligonucleotide, とくに, 中位の大きさの分析に最適である. そして, RNase-T₁ や RNase-I による分解物の分析のみならず, 5' 末端に phosphomonoester を持たない高分子核酸であれば, 5' 末端から 3 個までの塩基順列決定は容易にできる. そしてこの方法はポリヌクレオキナーゼによる方法^(24,25) と比べ, アイソトープ使用や, 決定できるヌクレオチド残基の数において異なるものと思われる.

要 旨

(1) Oligonucleotide の塩基順列決定法として, 家蚕消化液ヌクレアーゼの使用を考え, 次のモデル実験を行なった. まず, RNase-I による RNA 分解物より, penta- から heptanucleotide を調製し, 各々をモデルの基質として, このヌクレアーゼを作用させた. 続いて再分解物は, 7 M 尿素 DEAE-セルロースカラムにより分離し, 脱塩後, アルカリ分解, ペーパークロマトグラフィーにより同定した. この結果, どの oligonucleotide の再分解物も, 7 M 尿素 DEAE-セルロースカラム (pH 7.5) で, 磷酸基による陰電荷順に 6 つのピークに分かれた. (−1) 価に相当するピークは NpN であり, (−2) 価のピークは少量の pN を含むが, 大部分は NpNpN であり, いずれも 5' 末端に由来する fragment である. そして, これらを重ね合わせるにより, 5' 末端から 3 個までのヌクレオチド順列を確実に決めることができる. 一方, (−5) 価, (−6) 価のピークはそれぞれ 3' 末端から生じた pNpNp と pNpNpNp であり, やはり同様に 3' 末端から 3 個までのヌクレオチドを決定することができる. また, (−3) 価は pNpN, (−4) 価は pNp と pNpNpN であり, このうち pNp 以外は, 元の基質の内部鎖に由来するものであり, アルカリ分解するか, このまま分解せずに分析することにより内部の塩基順列の確認, あるいは高級 oligonucleotide の分析に役立つ. そして本法は単に oligonucleotide の分析だけでなく, 5' 末端に磷酸基を持たない高分子の核酸であれば, 5' 末端から 3 個までのヌクレオチド順列決定が可能である.

(2) この酵素は pentanucleotide を, 最初次のように分解した.

本研究の要は昭和 42 年 5 月, 日本農芸化学会西日本支部第 109 回例会で発表された.

- (1) R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick and A. Zamir: *Science*, **147**, 1462 (1965).
- (2) J. T. Madison, G. A. Everett and H. Kung: *ibid.*, **153**, 531 (1966).
- (3) H. G. Zachau, D. Dutting and H. Feldmann: *Angew. Chem.*, **78**, 392 (1966).
- (4) A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith and R. Kita: *Biochem. J.*, **60**, 541 (1955).
- (5) R. Markham and J. D. Smith: *Nature*, **168**, 406 (1951).
- (6) D. M. Brown, C. A. Dekker and A. R. Todd: *J. Chem. Soc.*, 2715 (1952).
- (7) K. Sato and F. Egami: *J. Biochem.*, **44**, 1 (1957).
- (8) G. W. Rushizky and C. A. Knight: *Virology*, **11**, 236 (1962).
- (9) K. Miura: *J. Mol. Biol.*, **8**, 371 (1964).
- (10) A. Zamir, R. W. Holley and M. Marquisee: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1267 (1965).
- (11) R. W. Holley, J. T. Madison and A. Zamir: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 389 (1964).
- (12) J. I. Mukai and E. I. Soeda: *Biochem. Biophys. Acta*, **138**, 1 (1967).
- (13) 向井純一郎, 添田栄一, 原 彰, 阿久根了: *Amino Acid and Nucleic Acid 酸酵と代謝*, **14**, 87 (1966).
- (14) J. I. Mukai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 562 (1966).
- (15) 向井純一郎, 原 彰, 松本昭子, 阿久根了: *農化*, **40**, 341 (1966).
- (16) A. M. Crestfield, K. C. Smith and F. W. Allen: *J. Biol. Chem.*, **216**, 185 (1955).
- (17) R. V. Tomlinson and G. M. Tener: *Biochemistry*, **2**, 703 (1963).
- (18) 中尾義雄: *栄養, 食糧, 酸酵外国文献会誌*, **14**, A 33 (1963).
- (19) 向井純一郎, 原 彰, 添田栄一, 阿久根了: *農化*, **40**, 165 (1966).
- (20) D. B. Strans and E. Goldwasser: *J. Biol. Chem.*, **236**, 849 (1961).
- (21) 昭和 42 年度農芸化学会大会講演.
- (22) E. I. Soeda, J. I. Mukai and S. Akune: *J. Biochem.*, **63**, 14 (1968).
- (23) D. Bell, R. V. Tomlinson and G. M. Tener: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 304 (1963).
- (24) M. Takanami: *J. Mol. Biol.*, **23**, 135 (1967).
- (25) C. C. Richardson: *ibid.*, **15**, 49 (1966).