Aspergillus oryzae のセラミド

大西正男, 藤野安彦

(帯広畜産大学農産化学科)

昭和 49 年 11 月 7 日 受理

Ceramide in *Aspergillus oryzae*

By Masao OHNISHI and Yasuhiko FUJINO

Department of Agricultural Chemistry, Obihiro University, Obihiro, Hokkaido

Ceramide was isolated from *Aspergillus oryzae*, and its constituting fatty acids and long chain bases were analyzed. The major fatty acids were lignoceric, 2-hydroxylignoceric and 2,3-dihydroxylignoceric acid, especially the latter two. The dominating long chain base was phytosphingosine.

(Received November 7, 1974)

膜脂質のひとつとして、スフィンゴ脂質が生物界に広く分布する。この脂質は微生物界では細菌および酵母についてはかなりよく研究されているが、カビでは *Penicillium notatum*⁽¹⁾, *Aspergillus niger*⁽²⁾ および *Phycomyces blakesleanus*⁽³⁾ および *Fusarium lini*⁽³⁾ について報告されているにすぎない。われわれは黄こうじかび *Aspergillus oryzae* (以下 *A. oryzae* と記す) の脂質の中に、比較的少量のセラミドとセレブロシドが存在することを認めた。今回は、そのうちのセラミドについて、その単離と化学的組成を報告する。

実験方法

1. セラミドの分離

(1) 菌叢の培養：こうじかびとしては、*A. oryzae* IFO 4290 を用いた。培養は 1 l の蒸留水中に MgSO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1.0 g, KCl 0.5 g, NaNO_3 2.0 g, sucrose 30.0 g および酵母エキス 1.0 g を含む Czapek 液体培地で 10 日間、 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ で振盪して行なった。定常期に達した菌叢はスツェでこし、十分に洗浄して 1.5 kg (湿重量) の供試材料を得た。

(2) 脂質の抽出と分画：凍結乾燥した菌叢を 10 倍容のクロロホルム-メタノール (2:1) および (1:2) で各 2 回抽出し、全抽出液を水洗、濃縮して全脂質を得た。収量 24.7 g。この全脂質をケイ酸カラムクロマトグラフィーに供してクロロホルムおよびメタノールで溶出

させ、中性脂質画分と極性脂質画分に分別した⁽⁴⁾。極性脂質画分は、さらにアセトンとメタノールによる再ケイ酸カラムクロマトグラフィーに供して、糖脂質画分およびリン脂質画分に分別した⁽⁵⁾。

(3) セラミドの精製：糖脂質画分をケイ酸カラムクロマトグラフィー⁽⁶⁾に供し、クロロホルム-アセトン (8:2 から 1:1 まで) によって粗セラミドを溶出した。またリン脂質画分をケイ酸カラムクロマトグラフィー⁽⁷⁾に供し、クロロホルム-メタノール (9:1) によって同じく粗セラミドを溶出した。合わせて約 1.5 g の粗セラミドをクロロホルム-メタノール (95:12) によるケイ酸薄層クロマトグラフィー、弱アルカリ水解⁽⁸⁾、クロロホルム-メタノール (95:5, 90:10 および 80:20) による再ケイ酸カラムクロマトグラフィーおよびメタノールからの再結によって精製し、セラミド 90 mg を得た。

2. セラミドの分析

(1) 赤外線吸収スペクトル分析：脂質 3 mg を KBr の錠剤とし、日本分光工業製 IR-G 型自記赤外線分光光度計を用いて測定した。

(2) セラミドの分解：セラミド 10 mg を、5 ml の 5% 無水メタノール性塩化水素とともに 4 時間封管中で加熱し、放冷した後、加水分解物から脂肪酸メチルエステルをヘキサンで抽出した⁽⁹⁾。これを、ヘキサン-エーテル (80:20) によるケイ酸薄層クロマトグラフィーに供し、ノルマル-, モノオキシ- およびジオキシ- の各脂

肪酸メチルエステルに分離した⁽¹⁰⁾.

またセラミド 20 mg を 10 ml の 1 N メタノール性水酸化カリウムで 20 時間還流加熱し, 放冷した後, エーテルでスフィンゴシン塩基を抽出した.

ジオキシ脂肪酸メチルおよびスフィンゴシン塩基の一部について, 過ヨウ素酸酸化を行なった⁽¹¹⁾. 試料 2 mg を 1 ml のメタノールに溶解し, 0.2 ml の 0.2 M メタ過ヨウ素酸ソーダを加えて 1 時間, 暗所で室温に放置した. ついでヘキサンで抽出し, 水洗, 濃縮して脂肪性アルデヒドを得た.

(3) ガスクロマトグラフィー: 日立製作所製 063 型ガスクロマトグラフを用いて行なった. カラムは 0.3×200 cm あるいは 0.3×100 cm のガラス管, キャリヤガスは窒素を使用した. ノルマル脂肪酸メチルと脂肪性アルデヒドの分析は, 10% DEGS-Chromosorb W を充填剤とし, カラム温度はそれぞれ 180°C , 150°C で行なった. モノ-とジオキシ脂肪酸メチルおよびスフィンゴシン塩基は, トリメチルシリル (TMS) エーテルに誘導した後⁽¹²⁾, 充填剤 Diasolid ZS, Diasolid ZT および 5% SE-30-Chromosorb W を用い, カラム温度 190°C , 210°C あるいは 230°C でガスクロマトグラフィーに供した.

(4) ガスクロマトグラフィー-質量分析: 日立製作所製 RMU-6 MG 型ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GCMS) を使用した. カラムは 0.3×100 cm のガラス管, キャリヤガスはヘリウム, 充填剤は試料に応じて Dia-

solid ZS, Diasolid ZT, 1.5% OV-17-Shimalite W および 0.5% EGA-Chromosorb W を用いた. カラム温度は, 脂肪性アルデヒドのときは $120^{\circ}\text{C} \sim 160^{\circ}\text{C}$ での, モノ-とジオキシ脂肪酸メチルのときは $150^{\circ}\text{C} \sim 180^{\circ}\text{C}$ での, およびスフィンゴシン塩基のときは $190^{\circ}\text{C} \sim 210^{\circ}\text{C}$ での, それぞれ毎分 2°C の昇温とした. 質量分析の条件は, イオン源温度: 220°C , イオン化電圧: 20 eV, イオン加速電圧: 3.2 kV および全放射電流: 80 μA とした.

実験結果

1. セラミドの同定

A. oryzae のセラミドをクロロホルム-メタノール (80:20) でのケイ酸薄層クロマトグラフィー⁽¹³⁾に供したところ, ただひとつのスポット (R_f : 0.78) が得られ, R_f は標準品⁽¹⁴⁾のそれと一致した. またモリブデン青 (リン), アンスロン (糖), ニンヒドリン (遊離アミノ基) および塩基性硝酸ビスマス-ヨウ化カリウム (コリン) 試薬に対する反応は, いずれもマイナスであった. このセラミドを赤外線吸収スペクトル分析に供したところ, 1640 cm^{-1} と 1540 cm^{-1} に酸アミドの吸収が認められ, 1730 cm^{-1} のエステルカルボニル基の吸収および 1240 cm^{-1} のリン酸の吸収は認められなかった (Fig. 1). ピークのパターンは, アルファルファのセラミド⁽¹⁵⁾のそれとはほぼ一致した. ただし, 970 cm^{-1} のトランス二重結合に由来する吸収が見られないことから, 構成塩基は飽和型と推定された.

Fig. 1. Infrared Spectra (in KBr) of *A. oryzae* Ceramide.

Fig. 2. Infrared Spectra (in KBr) of *Rf*: 0.28 Ester and *Rf*: 0.03 Ester from *A. oryzae* Ceramide.

2. セラミドの構成脂肪酸

(1) 脂肪酸のタイプ: セラミドから得られた脂肪酸メチルをヘキサソ-エーテル (80:20) によるケイ酸薄層クロマトグラフィー⁽¹⁰⁾に供したところ, *Rf*: 0.99, 0.28 および 0.03 の3つのエステルスポットが見出され, 前2者はそれぞれノルマル脂肪酸メチルと2-オキシ脂肪酸メチルに相当した. 薄層プレートから *Rf*: 0.28 エステルと *Rf*: 0.03 エステルを分離し, 赤外線吸収スペクトル分析に供した結果を Fig. 2 に示す. 両者とも 1735 cm^{-1} にエステルカルボニル基の吸収が見られたほか, *Rf*: 0.28 エステルでは, 3500 cm^{-1} に O-H の伸縮振動に由来する単一の浅いピークが, また *Rf*: 0.03 エステルでは 3260 cm^{-1} と 3430 cm^{-1} に O-H に由来する2つの深い吸収が認められた. この両者の IR パターンは, 酵母のセラプリンリン酸からの2-オキシヘキサコサン酸メチル, および2,3-ジオキシヘキサコサン酸メチルのそれ⁽¹⁶⁾とほぼ一致した. これらの成績から *Rf*: 0.99, 0.28 および 0.03 の各スポットは, それぞれノルマル酸, 2-オキシ酸および2,3-ジオキシ酸を示すものと考えられた. これらの3つの型の脂肪酸の相対割合をデンストメトリーで求めたところ, 約0.3:1.0:1.0であった.

(2) 脂肪酸の組成: 3つの型の脂肪酸の相対割合と, それぞれのガスクロマトグラムとから算出したセラミドの構成脂肪酸の組成を Table I に示す. ノルマル酸は市販の標準脂肪酸との同時クロマトグラフィーによ

Table I. Composition of Fatty Acids in *A. oryzae* Ceramide (%)

Fatty acid	Type→		Normal		2-Hydroxy		2,3-Dihydroxy	
	A*	B**	A*	B**	A	B	A	B
12:0	0.2	<0.1	—	—	—	—	—	—
UK	0.1	<0.1	—	—	—	—	—	—
13:0	0.1	<0.1	—	—	—	—	—	—
UK	1.9	0.3	—	—	—	—	—	—
14:0	3.1	0.4	—	—	—	—	—	—
14:1	0.2	<0.1	—	—	—	—	—	—
UK	0.1	<0.1	—	—	—	—	—	—
15:0	1.6	0.2	—	—	—	—	—	—
15:1	0.1	<0.1	—	—	—	—	—	—
UK	0.2	<0.1	—	—	—	—	—	—
16:0	20.9	2.7	—	—	—	—	—	—
16:1	2.6	0.3	—	—	—	—	—	—
UK	0.3	<0.1	—	—	—	—	—	—
17:0	0.9	0.1	—	—	—	—	—	—
17:1	0.3	<0.1	—	—	—	—	—	—
18:0	11.3	1.5	2.3	1.0	<0.1	<0.1	—	—
18:1	4.4	0.6	—	—	—	—	—	—
18:2	1.1	0.1	—	—	—	—	—	—
20:0	0.4	0.1	0.3	0.1	—	—	—	—
22:0	2.4	0.3	0.7	0.3	0.3	0.1	—	—
23:0	2.1	0.3	2.7	1.2	1.3	0.6	—	—
23:1	0.5	0.1	—	—	—	—	—	—
24:0	41.4	5.4	84.9	36.9	84.4	36.7	—	—
24:1	3.8	0.5	—	—	—	—	—	—
25:0	—	—	6.5	2.8	12.2	5.3	—	—
26:0	—	—	2.6	1.2	1.8	0.8	—	—
27:0	—	—	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	—	—

A*: % for the type fatty acids, B**: % for the total fatty acids.

って同定された。全部で24種類が見出され、そのうち主要な脂肪酸はリグノセリン酸、パルミチン酸およびステアリン酸であった。2-オキシ酸の同定は、牛脊髓のブレノシンから得た2-オキシ酸メチル⁽¹⁷⁾の保持時間との比較によって行なった。全部で8個見出され、おもなものはオキシリグノセリン酸であった。2,3-ジオキシ酸はそれらの過ヨウ素酸酸化で得られたアルデヒド⁽¹¹⁾のガスクロマトグラフィーでの保持時間と標準のC₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ および C₂₀ の飽和の直鎖アルデヒドのそれとの

比較によって同定した。全部で7個見出され、その組成は2-オキシ酸のそれとよく似ていて、おもなものはジオキシリグノセリン酸であった。

(3) オキシ酸の確認：主要なオキシ酸（オキシリグノセリン酸）のマススペクトルをFig. 3に示す。分子量を示すイオンとして m/e 470 (M⁺), 455 (M-15) および 427 (M-15-28), また水酸基の位置が2-Cであることを示すフラグメントイオン⁽¹⁸⁾として、411 (M-59) と 89 [(CH₃)₃Si⁺-OCH₃] が認められた。これは、こ

Fig. 3. Mass Spectrum of Hydroxylignoceric Acid in *A. oryzae* Ceramide.

TMS ether derivative of hydroxylignoceric acid methylester was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. A glass column was packed with 1.5% OV-17. The temperature of column and ion source were 190°C~290°C, 220°C, respectively. The energy level of the ion source was 20 eV and the ionizing current 80 μA.

Fig. 4. Mass Spectrum of Dihydroxylignoceric Acid in *A. oryzae* Ceramide.

TMS ether derivative of dihydroxylignoceric acid methylester was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry under the same conditions as described in Fig. 3.

の脂肪酸が 2-オキシテトラコサン酸であることを確認するものである。他の 7 つのオキシ酸についても同じように GC-MS による解析を行ない、いずれも 2-オキシのそれぞれオクタデカン酸、エイコサン酸、ドコサン酸、トリコサン酸、ペンタコサン酸、ヘキサコサン酸およびヘプタコサン酸であることを確認した。

(4) ジオキシ酸の確認：主要なジオキシ酸（ジオキシリグノセリン酸）のマススペクトルを Fig. 4 に示

す。C₂₄ のジオキシ酸メチルに相当する分子イオン (*m/e* 558) は認められなかったが、M-15 (*m/e* 543) が認められた。また 2-C に水酸基があることを示唆するイオンとして、4-C からの水素原子の再配列⁽¹⁹⁾に由来する *m/e* 162 と、2-C からのトリメチルシリル基の再配列⁽¹⁹⁾に由来する *m/e* 234 が認められた。さらに 3-C に水酸基があることを示すイオンとして、2-C と 3-C 間の開裂に由来する *m/e* 397 が認められた。これらの開裂パター

Fig. 5. Mass Spectrum of Docosanal Originating from 2,3-Dihydroxylignoceric Acid.

Docosanal was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry under the same conditions as described in Fig. 3, except that a glass column was packed with 0.5% EGA and the temperature of column was 120°C~160°C.

Fig. 6. Infrared Spectra (in KBr) of Long Chain Base in *A.oryzae* Ceramide.

ンは, 2,3-ジオキシヘキサコサン酸メチルのそれ⁽¹⁶⁾と類似していた。

次にジオキシシグノセリン酸を過ヨウ素酸で酸化して得られたアルデヒドを質量分析に供した成績を Fig. 5 に示す。分子量を示すイオンとして, m/e 324 (M^+), 306 ($M-18$), 280 ($M-44$) および 278 ($M-46$) が認め

られた。また, 炭化水素鎖に由来する $\begin{array}{c} \text{CH=CH} \\ | \quad | \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\ | \quad | \\ \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n \end{array}$ ($n=0\sim 14$) の各フラグメントイオン^(20,21)が認められた。これらの成績は, このアルデヒドがドコサナールであることを示す。同様に, 他のジオキシ酸に由来するアルデヒドもそれぞれ同定された。以上の成績は, これらの7つの脂肪酸がいずれも 2,3-ジオキシのオクタデカン酸, ドコサン酸, トリコサン酸, テトラコサン酸, ペンタコサン酸, ヘキサコサン酸およびヘプタコサン酸であることを意味する。

3. セラミドの構成長鎖塩基

(1) 長鎖塩基のタイプ: セラミドから得られた長鎖塩基をクロロホルム-メタノール-2Nアンモニア (40:10:1) によるケイ酸薄層クロマトグラフィー⁽²²⁾に供したところ, 2つのニンヒドリン陽性のスポットが認められた。主要なスポットの R_f (0.27) は, 標準のスフィンゴシン (R_f : 0.58) とジヒドロスフィンゴシン (R_f : 0.45) のそれよりも低かったのでトリオキシ塩基と推定され⁽²²⁾, また微量のスポット (R_f : 0.76) はテトラヒドロフラン構造の副産物⁽²³⁾と推定された。この長鎖塩

基を赤外線吸収スペクトル分析に供した結果を Fig. 6 に示す。3300 cm^{-1} と 1550 cm^{-1} に第1級アミンの吸収が認められ, 全体のパターンはアルファルファのセレブロシドの長鎖塩基 (おもにデヒドロフィトスフィンゴシン)⁽²⁴⁾ のそれとほぼ一致した。ただし, *A. oryzae* の長鎖塩基は, トランス二重結合に由来する 970 cm^{-1} の吸収を示さなかったから, 恐らくフィトスフィンゴシンの同族体と推定された。

(2) 長鎖塩基の組成: 長鎖塩基をガスクロマトグラフィーに供した結果を Fig. 7 に示す。6つのピーク

Fig. 7. Gas-liquid Chromatogram of Long Chain Base in *A. oryzae* Ceramide.

TMS ether derivatives of long chain base were analyzed by gas-liquid chromatography. A glass column, 0.3 $\times$ 100 cm, was packed with Diasolid ZT. Temperature was 190°C.

1, 2 and 3: tetrahydrofuran artifacts from C_{18} -, C_{19} - and C_{20} - trihydroxy base. 4, 5 and 6: C_{18} -, C_{19} - and C_{20} -trihydroxy base.

Fig. 8. Mass Spectrum of Phytosphingosine in *A. oryzae* Ceramide.

TMS ether derivative of phytosphingosine was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry under the same conditions as described in Fig. 3, except that a glass column was packed with Diasolid ZT and temperature was 190°C.

が認められ、これらは文献^(4,12)の保持時間と比較して、3つはトリオキシ長鎖塩基からのテトラヒドロフラン構造の副産物、他の3つはトリオキシ長鎖塩基と考えられた。おもなものは、 C_{18} -トリオキシ塩基のフィトスフィンゴシン (84.3%) であった。

(3) 長鎖塩基の確認: 主要な長鎖塩基 (フィトスフィンゴシン) のマスペクトルを Fig. 8 に示す。分子量を示すイオンとして m/e 533 (M^+) と 518 ($M-15$)、極性部の性質を示すフラグメントイオン^(25,26)として 1-C と 2-C 間の開裂に由来する m/e 103、2-C と 3-C 間の開裂に由来する m/e 132 および 3-C からのトリメチルシリル基の再配列⁽¹⁹⁾に由来すると推定される m/e 204 が認められた。また、炭素鎖を決定するフラグメントイオンとして m/e 430 ($M-103$)、401 ($M-132$)、340 ($M-90-103$) および 299 ($M-234$) が認められた。このことから、この長鎖塩基はフィトスフィンゴシンと同定された。同様に他の2つの長鎖塩基は、それぞれ C_{19} および C_{20} のフィトスフィンゴシンと同定された。また副産物のマスペクトルでは、テトラヒドロフラン構造に特徴的なフラグメントイオン m/e 129⁽²⁷⁾が見られた。

次に、スフィンゴシン塩基の過ヨウ素酸酸化で得られたアルデヒドをガスクロマトグラフィーに供したところ、3つのピークが認められた。各ピークアルデヒドのマスペクトルは、Fig. 5 と同じく飽和直鎖のアルデヒドに特徴的な開裂パターンを示し、それぞれ C_{18} 、 C_{19} および C_{20} のフィトスフィンゴシンに由来するペンタデカナール、ヘキサデカナールおよびヘプタデカナールであることが確認された。

考 察

A. oryzae のセラミドを構成する主要脂肪酸は、リグノセリン酸、オキシリグノセリン酸およびジオキシリグノセリン酸、とくに後2者で、主要長鎖塩基はフィトスフィンゴシンであった。ゆえに、*A. oryzae* のセラミドの代表的分子種はN-リグノセリル-フィトスフィンゴシン、N-オキシリグノセリル-フィトスフィンゴシンおよびN-ジオキシリグノセリル-フィトスフィンゴシンであると推定される。

セラミドは、カビではこれまでに *Aspergillus niger*⁽²⁾、*Phycomyces blakesleeianus*⁽³⁾ および *Fusarium lini*⁽³⁾ に見出されている。*A. oryzae* のセラミドの主要酸は、 C_{26} 酸であったが、*Aspergillus niger*⁽²⁾ のそれは C_{14} 酸、

Phycomyces blakesleeianus⁽³⁾ と *Fusarium lini*⁽³⁾ のそれは C_{18} 酸と C_{16} 酸であった。また *A. oryzae* のセラミド中に見出されたジオキシ酸は、他のカビ類では認められなかった。一方 *A. oryzae* セラミドの主要長鎖塩基のフィトスフィンゴシンは、他のカビ類のセラミドにも含まれていたが、これらのカビのセラミドが有するジオキシ長鎖塩基と分枝長鎖塩基は、*A. oryzae* には見出されなかった。このように見てくると、*A. oryzae* のセラミドの構成成分の組成は、他のカビのセラミドのそれとは幾分違っていると考えられる。

要 約

A. oryzae からセラミドを単離し、その構成成分の組成を調べた。主要構成脂肪酸はリグノセリン酸、2-オキシリグノセリン酸、および 2,3-ジオキシリグノセリン酸で、とくに後2者が多かった。構成長鎖塩基としては、フィトスフィンゴシンが大部分を占めていた。

A. oryzae の培養をしてくださった京都大学農学部農薬研究施設の上山昭則助教授に謝意を表する。

- (1) 小田 武: 薬学雑誌, **72**, 136 (1952).
- (2) H. Wagner and E. Fiegert: *Z. Naturf.*, **24**, 359 (1969).
- (3) B. Weiss and R. L. Stiller: *Lipids*, **8**, 25 (1973).
- (4) H. E. Carter and C. B. Hirschberg: *Biochemistry*, **7**, 2296 (1968).
- (5) G. Rouser, G. Kritchevsky, G. Simon and G. T. Nelson: *Lipid*, **2**, 37 (1967).
- (6) 伊藤精亮, 藤野安彦: 農化, **46**, 319 (1972).
- (7) 伊藤精亮, 藤野安彦: 農化, **48**, 43 (1974).
- (8) R. M. C. Dawson: *Biochem. J.*, **75**, 45 (1960).
- (9) W. Stoffel, F. Chu and E. H. Ahrens: *Anal. Chem.*, **31**, 307 (1959).
- (10) E. Vioque and R. T. Holman: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294 (1965).
- (11) C. C. Sweeley and E. A. Moscatelli: *J. Lipid Res.*, **1**, 40 (1959).
- (12) H. E. Carter and R. C. Gaver: *ibid.*, **8**, 391 (1967).
- (13) K. A. Karlsson and I. Pascher: *ibid.*, **12**, 466 (1971).
- (14) H. E. Carter, J. A. Rothfus and R. Gigg: *ibid.*, **2**, 228 (1961).
- (15) Y. Fujino and S. Ito: *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 242 (1971).
- (16) M. Hoshi, Y. Kishimoto and C. Hignite: *J. Lipid Res.*, **14**, 406 (1973).

- (17) M. Nakano, S. Ito and Y. Fujino : *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 500 (1972).
- (18) P. Capella, C. Galli and R. Fumagalli : *Lipids*, **3**, 431 (1968).
- (19) "Mass Spectrometry of Organic Ions," ed. by F. McLafferty, Academic Press, New York, 1963, p. 309.
- (20) K. Christiansen, V. Mahadevan, C. V. Viswanathan and R. T. Holman : *Lipids*, **4**, 421 (1969).
- (21) K. A. Karlsson, B. E. Samuelsson and G. O. Steen : *Biochim. Biophys. Acta*, **316**, 336 (1973).
- (22) K. Sambasivarao and R. H. McCluer : *J. Lipid Res.*, **4**, 106 (1963).
- (23) K. A. Karlsson : *Lipids*, **5**, 878 (1970).
- (24) S. Ito and Y. Fujino : *Can. J. Biochem.*, **51**, 957 (1973).
- (25) K. A. Karlsson : *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2884 (1966).
- (26) A. Hayashi and F. Matsuura : *Chem. Phys. Lipids*, **10**, 51 (1973).
- (27) F. J. Schmitz and F. J. McDonald : *J. Lipid Res.*, **15**, 158 (1974).
-