報 文

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.58, No.5, pp.441~447, 1984]

ブタ小腸粘膜の可溶性アシルアミダーゼの 精製と若干の性質

長谷川喜斐*, 児玉 治, 赤塚尹巳
(*福島県立会津短期大学, 茨城大学農学部)

昭和 58 年 9 月 6 日 受 理

Purification and Some Properties of an Arylamidase of Hog Small Intestinal Mucosa in Soluble Fraction

Yoshii HASEGAWA*, Osamu KODAMA and Tadami AKATSUKA

*Aizu Junior College of Fukushima Prefecture, Aizuwakamatsu, Fukushima 965

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki 300-03

A soluble arylamidase from the hog small intestinal mucosa was purified by ammonium sulfate fractional precipitation, Sephadex G-200 gel filtration, column chromatography on DEAE-cellulose and a second Sephadex G-200 gel filtration. The final preparation was homogeneous in polyacrylamide gel disc electrophoresis at pH 8.3 and was purified approximately 140-fold.

The molecular weight of this enzyme was estimated to be approximately 13×10^4 . The maximum activity was observed at a concentration of 1×10^{-3} M cysteine or reduced glutathione and was accelerated about 1.5-fold by the addition of 1×10^{-4} M Co^{2+} . This enzyme strongly hydrolyzed L-lysyl-*p*-nitroanilide, L-leucyl- β -naphthylamide and L-leucyl-*p*-nitroanilide, but weakly hydrolyzed L-leucylglycylglycine and L-leucylglycine.

(Received September 6, 1983)

緒 言

ブタ小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究は古くから行われ, Linderstrøm Lang⁽¹⁾, Johnson ら⁽²⁾, Smith ら⁽³⁾の報告がある。しかし, これらの報告は酵素を高純度に精製し, その詳細な性質を明らかにしたものではなく, 粗酵素画分を用いて, 若干のペプチド類に対する加水分解活性や二, 三の金属イオンの影響などについて検討したものである。

最近に至り, ブタ小腸粘膜のペプチダーゼに関する研究の再検討が行われた。Norén ら⁽⁴⁾は可溶性ジペプチダーゼの精製と特異性に関する報告を行った。また, Sjöström ら⁽⁵⁾による可溶性プロリダーゼの精製と特異性に関する報告がある。他方, Maroux ら⁽⁶⁾はブタ小腸の brush border 膜結合ペプチダーゼに関する研究を報告

した。brush border 膜結合ペプチダーゼは, アミノペプチダーゼ, ジペプチダーゼ, トリペプチダーゼおよびアシルアミダーゼを含んでいるが, 彼らはとくにアミノペプチダーゼの可溶化を行い, 精製しその性質について詳細な報告を行っている。

著者ら⁽⁷⁾は先にブタ小腸粘膜のペプチダーゼを膜結合酵素と可溶性酵素に分け, 後者に属するトリペプチダーゼ [EC 3.4.1.3] をディスク電気泳動的に均質な酵素として初めて精製し, その性質を明らかにした。

本報告はブタ小腸粘膜の可溶性画分に含まれるアシルアミダーゼをディスク電気泳動的に均質な酵素として精製し, 本酵素の若干の性質について明らかにしたものである。なお, 本報告で対象とした酵素は先に Behal ら⁽⁸⁾がヒト小腸から部分精製したものと同種であると推定される。それはロイシル-グリシンに対する活性を有し,

かつロイシン- β -ナフチルアミドに対しても作用すると報告されているからである。

試料および方法

1. 試料 屠殺直後のブタ小腸粘膜を使用した。なお、この試料はコアミ畜産株式会社より恵与された。

2. 試薬 Sephadex G-200 は Pharmacia Fine Chemical Co. および DEAE-セルロースは Brown Co. より購入した。ロイシン- p -ニトロアニリドおよびリジン- p -ニトロアニリドは Merck, アラニン- p -ニトロアニリド, アルギニン- p -ニトロアニリド, グルタミン酸- p -ニトロアニリド, アスパラギン酸- p -ニトロアニリド, グリシル-プロリル-ロイシン- p -ニトロアニリドは蛋白質研究奨励会およびロイシル-グリシン, アラニル-グリシン, ロイシル-グリシル-グリシンは当研究室で合成したものを用いた。N- α -ベンゾイル-DL-アルギニン- p -ニトロアニリドは BDH Chemicals Ltd. より購入した。なお、使用したアミノ酸は DL-と特記しない限りすべて L-アミノ酸である。

3. 粗酵素液の調製 屠殺直後のブタの胃の末端部より約 5 cm 下から約 50 cm の小腸部分を切り開いて内容物を取り除いた後、内壁を氷冷水で軽く洗い、ガラス板を用いて粘膜をはぎとり、ビーカーに集めた。これに小腸粘膜重量の 3 倍量の冷リン酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.0) を加えて、ガラス棒を用いて 60 分間攪拌しながら抽出を行った後、3 枚重ねのガーゼを用いて濾過した。濾液を 3000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、沈殿を廃棄した。得られた上澄液をさらに 10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、上澄液を集めた。このときの沈殿部を再び冷リン酸緩衝液 (1/15 M, pH 7.0) に懸濁した後、30 分間攪拌しながら抽出を行い、10,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離を行った。得られた上澄液と先に集めた上澄液と合わせ、これを 105,000 $\times g$ で 60 分間遠心分離し、その上澄液を粗酵素液とした。

4. 酵素活性の測定

(1) アミノ酸- p -ニトロアニリドを基質にした場合: 試験管に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1.6 ml および酵素液 0.4 ml を加え 40°C, 5 分間放置後、0.6 mM のロイシン- p -ニトロアニリド溶液 0.4 ml を加え酵素反応を開始し一定時間反応させた後、反応混液の 405 nm における吸光度を測定した。405 nm における p -ニトロアニリンのモル吸光係数を 8800 M⁻¹, cm⁻¹ として⁽⁹⁾,

1 分間に 1 μ mol の p -ニトロアニリンを遊離する酵素量を 1 単位とした。

(2) ペプチドを基質にした場合: 試験管に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 ml および酵素液 10 μ l を加え 40°C, 5 分間放置後、10 mM のアラニル-グリシン溶液 20 μ l を加え酵素反応を開始し一定時間反応させた後、2 ml のニンヒドリン溶液を加え 100°C, 10 分間加熱後、水冷し 5 ml の 50% アセトンを加え、575 nm における吸光度を測定した。1 分間に 1 μ mol のアミノ酸 (グリシン当量) を遊離する酵素量を 1 単位とした。

なお、ニンヒドリン溶液の調製法は次のごとくである。すなわち、0.3 M クエン酸緩衝液 (pH 5.2) とメチルセロソルブを等容量含む液にニンヒドリンを 1% になるように加え、使用直前に必要量のニンヒドリン混合液に塩化第一スズ粉末を約 0.1% になるように加えた。

5. タンパク質濃度の測定 ウシ血清アルブミンを標準物質として、Lowry 法⁽¹⁰⁾により測定した。

6. ディスク電気泳動 Davis⁽¹¹⁾ の方法に準じて行った。すなわち、7.5% ポリアクリルアミドを用い、pH 8.3 で、カラム当り 2 mA, 90 分間通電した。ゲルは 0.5% アミドブラック 10 B で染色し、7% 酢酸で脱色した。

7. 分子量の推定 Andrews⁽¹²⁾ の方法に準じて酵素タンパク質の分子量を推定した。標準タンパク質としては、ウレアーゼ (分子量: 480,000, ナタマメ), カタラーゼ (分子量: 240,000, ウシ肝臓), およびヘモグロビン (分子量: 64,000, ウシ血液) を用いた。

ウレアーゼ活性は Vanslyke⁽¹³⁾ の方法, カタラーゼ活性は Beers⁽¹⁴⁾ の方法により測定し、溶出位置を求め、ヘモグロビンの溶出位置は 410 nm における吸光度より求めた。

実験結果

1. 可溶性アリルアミダーゼの精製

粗酵素液の硫酸分画を行い、60~80% 飽和区分を 6 ml の 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解しこれを硫酸分画酵素液とした。上記酵素液をあらかじめ 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-200 カラム (2 $\times$ 50 cm) を用いてゲル濾過し、溶出量約 113 ml に位置するアリルアミダーゼ活性区分を集めた。次に、この溶出区分をあらかじめ 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (1.7

Table I. Purification of Arylamidase from the Soluble Fraction of Hog Small Intestinal Mucosa

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)
105,000×g supernatant fraction	967.5	11,220	0.0116	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ fraction (60~80% saturation)	185.8	6,732	0.0362	60
Sephadex G-200 chromatography	66.6	7,028	0.1055	63
DEAE-cellulose chromatography	0.8	1,163	1.4540	10
Sephadex G-200 rechromatography	0.32	523	1.6340	4

×30 cm) に吸着させた。吸着したアリルアミダーゼは、同緩衝液中の食塩濃度を 0~0.5 M の範囲で直線的に上昇させて溶出した (Fig. 1)。さらに、DEAE-セルロースのアリルアミダーゼ活性画分 (No. 21~25) について Sephadex G-200 によるリクロマトグラフィーを行った結果、Fig. 2 に示したようにタンパク質およびアリルアミダーゼ活性の溶出ピークはよく一致した。また、各精製過程における活性収率、比活性等を Table I にまとめた。収率は 4% で約 140 倍に精製された。

精製酵素液について行ったディスク電気泳動の結果を Fig. 3 に示した。タンパク質のメインバンドと活性のピークはよく一致していることがわかった。次に、この精製酵素液を用いて以下の実験を行った。

Fig. 1. DEAE-Cellulose Column Chromatography of Arylamidase. The fraction from the Sephadex G-200 column was applied to a DEAE-cellulose column (1.7×30 cm) equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0). The column was washed with the same buffer and developed in a linear gradient formed from 400 ml of the same buffer in the mixer, and 400 ml of the same buffer containing 0.5 M NaCl in the reservoir. The flow rate was 32 ml per hr and fractions of 9.8 ml were collected. Enzyme activity for Leu-*p*-nitroanilide (1×10^{-4} M) was assayed by spectrophotometric method. ○, enzyme activity; ●, protein concentration; —, NaCl.

2. 分子量の推定

分子量既知の標準タンパク質とともに Sephadex G-200 を用いたゲル濾過法で、分子量の測定を行った結果を Fig. 4 に示した。精製酵素液の溶出量は 113 ml であり、その分子量は Andrews⁽¹²⁾ の方法により求めた結果、約 13 万と推定された。

3. 至適 pH

酵素活性に及ぼす pH の影響を調べた結果を Fig. 5 に示した。活性発現の最適 pH は 7.0 付近に認められた。

4. 至適温度

酵素反応に及ぼす温度の影響を pH 7.0, 30 分間の反応で調べた結果を Fig. 6 に示した。その結果、活性発現の最適温度は 50°C 付近に認められ、60°C において急激な活性低下が認められるが、比較的耐熱性の酵素であると考えられる。

5. 各種金属イオンの影響

各種金属イオン (1×10^{-4} M) のアリルアミダーゼ活性に及ぼす影響について、ロイシン-*p*-ニトロアニリドを

Fig. 2. Gel Filtration (2nd) of Arylamidase on Sephadex G-200. A column of Sephadex G-200 (2×50 cm) was equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 14 ml/hr. —, protein; ○, arylamidase activity.

基質とし、 1×10^{-3} M の 2-メルカプトエタノール存在下で、pH 7.0, 40°C において測定しその結果を Table II に示した。Zn²⁺ により強い阻害を受けた。Co²⁺ では約 1.5 倍の活性の促進が認められたが、他の金属イオンによってはほとんど影響が認められなかった。Fig. 7 は、

Fig. 3. Acrylamide Gel Electrophoresis of the Final Preparation and Measurement of Activity in Eluates from Gel Segments. Tube number 28 and 29 from the gel filtration was concentrated with the Minicon(B15), and then the sample was applied on the top of the gel. Electrophoresis was conducted at 2 mA per tube for 1.5 hr. Enzyme activity for Leu-*p*-nitroanilide (1×10^{-4} M) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol (1×10^{-3} M).

Fig. 5. Effect of pH on the Activity of Arylamidase. Enzymatic activities were determined with Leu-*p*-nitroanilide as a substrate. Buffers used were 1/15 M acetate buffer (pH 4.0~5.0), 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0~7.0) and 1/15 M veronal buffer (pH 8.0~8.5).

アリルアミダーゼ活性に及ぼす Co²⁺ 濃度の影響について検討した結果である。この Fig. 7 から、酵素活性を促進する最適濃度は 1×10^{-4} M であることがわかった。

6. 各種試薬の影響

各種試薬の酵素活性に及ぼす影響を、ロイシン-*p*-ニトロアニリドを基質とし、 1×10^{-3} M の 2-メルカプトエタノール存在下で pH 7.0, 40°C において測定し、その結果を Table III に示した。キレート試薬である EDTA

Fig. 4. Estimation of Molecular Weight by Gel Filtration on Sephadex G-200. A, hemoglobin; B, catalase; C, urease; D, soluble arylamidase from hog small intestinal mucosa. The enzyme and the standard protein solutions were applied to the column (2×50 cm) equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0)

Fig. 6. Effect of Temperature on the Activity of Arylamidase. Enzymatic activities were determined with Leu-*p*-nitroanilide as a substrate at 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) and indicated temperatures.

および *o*-フェナントロリンにより強く阻害され、界面活性剤の SDS、キモトリプシンの特異的阻害剤である TPCK により強く阻害された。

精製酵素は、SH 還元試薬が存在しないと急激な活性の減少が認められ、SH 還元試薬の添加により活性は回復した。システインおよび還元型グルタチオンでは $1 \times$

Fig. 7. Effect of Co^{2+} Concentration on the Activity of Arylamidase. Mixtures of the arylamidase and varying amounts of CoCl_2 were preincubated for 10 min at room temperature. After preincubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide (1×10^{-4} M) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol (1×10^{-3} M).

Table II. Effect of Various Metal Ions on the Activity of Arylamidase

Metal ions	Relative activity (%)
None	100
CoCl_2	166
MgCl_2	95
MnCl_2	100
ZnCl_2	0
CaCl_2	102

Mixtures of the arylamidase and indicated metal ions at concentration of 1×10^{-4} M (pH 7.0) were preincubated for 10 min at room temperature.

After preincubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide (1×10^{-4} M) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol (1×10^{-3} M) and compared with a control.

10^{-3} M で最も強く活性化された。

7. 基質特異性

p-ニトロアニリドの誘導体に対するアリルアミダーゼの基質特異性について検討した。その結果を Table IV

Table III. Effect of Various Reagents on the Activity of Arylamidase

Reagents	Remaining activity (%)
None (control)	100
Ethylene diamine tetraacetate (EDTA)	5
<i>o</i> -Phenanthroline	31
Phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF)	100
<i>N</i> -Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)	9
<i>N</i> -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	67
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0

Mixtures of the arylamidase and indicated reagents at concentration of 1×10^{-4} M (pH 7.0) were preincubated for 10 min at room temperature.

After preincubation, each activity for Leu-*p*-nitroanilide (1×10^{-4} M) was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol (1×10^{-3} M) and compared with a control.

Table IV. Action of the Arylamidase on Substrates

Substrate	Relative activity (%)
Leu- <i>p</i> -nitroanilide	100
Ala- <i>p</i> -nitroanilide	75
Arg- <i>p</i> -nitroanilide	53
Lys- <i>p</i> -nitroanilide	139
Glu- <i>p</i> -nitroanilide	0
Asp- <i>p</i> -nitroanilide	0
Gly-Pro-Leu- <i>p</i> -nitroanilide	0
Benzoyl-Arg- <i>p</i> -nitroanilide	0
Leu- β -naphthylamide	127
Leu-Gly	20
Ala-Gly	8
Leu-Gly-Gly	60

The final concentration of substrate was 1×10^{-4} M.

Enzyme activity was assayed by spectrophotometric method in the presence of 2-mercaptoethanol (1×10^{-3} M).

Relative activity was calculated with activity against Leu-*p*-nitroanilide taken as 100.

に示した。アシルアミダーゼは、リジン-*p*-ニトロアニリドを最もよく水解し、次いでロイシン-*p*-ニトロアニリド、アラニン-*p*-ニトロアニリド、アルギニン-*p*-ニトロアニリドの順に水解した。酸性アミノ酸であるアスパラギン酸およびグルタミン酸の *p*-ニトロアニリドは、いずれも水解しなかった。プロテイナーゼの合成基質であるベンゾイルアルギニン-*p*-ニトロアニリドおよびトリペプチドの *p*-ニトロアニリドであるグリル-プロリル-ロイシン-*p*-ニトロアニリドはいずれも水解しなかった。

また、ジペプチダーゼ活性およびトリペプチダーゼ活性の有無をロイシル-グリシン、アラニル-グリシンおよびロイシル-グリル-グリシンを基質として検討した。その結果、ロイシル-グリシンおよびロイシル-グリル-グリシンをも水解することがわかった。

考 察

著者らはブタ小腸粘膜の可溶性画分よりアシルアミダーゼの精製を行った。本酵素は精製後急激な活性の減少が認められるが、SH 還元試薬の添加により活性は回復する SH 依存性のアシルアミダーゼであった。

ラット表皮に認められる SH 依存性のアシルアミダーゼ⁽¹⁵⁾は、生体成分として存在するシステインおよびグルタチオンによって $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 付近において活性の極大が認められ、 $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 以上の SH 濃度になると著しく活性を阻害するが、合成化学薬品であるジチオスライトールおよびチオグリコール酸では $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 以上の濃度でも活性の低下は認められず、ブタ小腸粘膜の可溶性アシルアミダーゼと類似の傾向が認められ興味深い。しかし、ラット表皮のアシルアミダーゼは EDTA により全く阻害を受けない点でブタ小腸粘膜の可溶性アシルアミダーゼと異なる。

Fig. 7 に示したようにブタ小腸粘膜の可溶性アシルアミダーゼは $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の Co^{2+} により約 1.5 倍の活性化が認められたが、他の金属イオンによっては活性化は認められなかった。 Co^{2+} により活性化するアシルアミダーゼとしては、ラット肝臓のプラズマメンブランに結合しているアシルアミダーゼ⁽¹⁶⁾およびヒト肝臓のアシルアミダーゼ⁽¹⁷⁾が報告されている。両酵素とも PCMB により阻害を受けず、SH 還元試薬によっては活性化を受けない。

Mäkinen ら⁽¹⁸⁾はヒト皮膚のアシルアミダーゼがアラ

ニンおよびメチオニンの β -ナフチルアミドをよく水解し、 Co^{2+} および SH 還元試薬で活性化することを報告している。 Co^{2+} により活性化し SH 依存性のアシルアミダーゼの報告はきわめて少なく、著者らの知る限りでは、ヒト皮膚⁽¹⁸⁾およびラット表皮⁽¹⁵⁾のアシルアミダーゼのみである。

アミノペプチダーゼには、ペプチダーゼ活性およびアシルアミダーゼ活性のいずれも示す酵素と、ペプチダーゼ活性のみ示しアシルアミダーゼ活性を示さない酵素の 2 種類存在するが、本酵素はアシルアミダーゼ活性、ペプチダーゼ活性のいずれをも示しており、基質特異性の点からみれば、Maroux ら⁽¹⁹⁾が報告しているブタ小腸 brush border 膜に結合しているアミノペプチダーゼと類似している。

Norén ら⁽²⁰⁾はブタ小腸粘膜の可溶性画分からのジペプチダーゼの精製を報告している。このジペプチダーゼはロイシン-*p*-ニトロアニリドを水解せずアシルアミダーゼ活性を示さないことから可溶性画分のアシルアミダーゼとは異なる酵素であろう。

要 約

(1) ブタ小腸粘膜より可溶性アシルアミダーゼを抽出し、硫安分画、Sephadex G-200 によるゲル濾過および DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行った後、再び Sephadex G-200 を用いてゲル濾過により精製した。精製した酵素液は pH 8.3 のポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動によりほぼ均一であると認められた。比活性は約 140 倍増加した。

(2) 本酵素の分子量は約 13×10^4 と推定された。

(3) 本酵素はシステインおよび還元型グルタチオンにより $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の濃度で最も強く活性化し、また、 $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ の Co^{2+} により約 1.5 倍に活性が促進された。

(4) 本酵素はリジン-*p*-ニトロアニリド、ロイシン- β -ナフチルアミドおよびロイシン-*p*-ニトロアニリドを強く加水分解した。また、本酵素はロイシル-グリル-グリシンおよびロイシル-グリル-グリシン等のペプチド類に対しても活性を示した。

- (1) K. Linderström Lang: *Z. Physiol. Chem.*, **188**, 48 (1930).
- (2) M. J. Johnson: *J. Biol. Chem.*, **122**, 89 (1937).
- (3) E. L. Smith and M. Bergmann: *J. Biol. Chem.*, **153**, 627 (1944).

- (4) O. Norén, H. Sjöström and L. Josefsson : *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 446 (1973).
 - (5) H. Sjöström, O. Norén and L. Josefsson : *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 457 (1973).
 - (6) S. Maroux, D. Louvard and J. Baratti : *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 282 (1973).
 - (7) 長谷川喜斐, 志賀利勝, 児玉 治, 赤塚尹巳 : 農化, **58**, 9 (1984).
 - (8) F. J. Behal, B. Asserson, F. Dawson and J. Hardman : *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 335 (1965).
 - (9) B. F. Erlanger, N. Kakowsky and W. Cohen : *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
 - (10) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 - (11) B. J. Davis : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 373 (1964).
 - (12) P. Andrews : *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965).
 - (13) D. D. Vanslyke and R. M. Archibald : *J. Biol. Chem.*, **154**, 623 (1944).
 - (14) R. F. Beers and I. W. Sizer : *J. Biol. Chem.*, **195**, 133 (1952).
 - (15) 富原靖博, 菅原 潔, 児玉 治, 大内 毅 : 茨城大農学術報告, No. 24, 103 (1976).
 - (16) P. Emmelot and A. Visser : *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 273 (1971).
 - (17) W. G. Charles and F. J. Behal : *Biochemistry*, **13**, 3227 (1974).
 - (18) P. L. Mäkinen and J. Paekallio : *Enzymologia*, **36**, 93 (1969).
 - (19) S. Maroux, D. Louvard and J. Baratti : *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 282 (1973).
 - (20) O. Norén, H. Sjöström and L. Josefsson : *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 446 (1973).
-