細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究
－リン脂質物性のコスメトロジーへの応用－

東北大学大学院理学研究科
大　木　和　夫

Cosmetology includes physiological approach to skincells of human body. And all cells are constructed with biomembranes which are assemblies of lipids, proteins and various minor constituents held together by non covalent interactions. Membrane lipids are amphipathic molecules, and they spontaneously form bilayers in aqueous environments. Hydration of lipids plays an important role in this process. So the hydration was investigated in various phospholipid species by an optical microscope with image processing devices. Interaction of membrane proteins with lipids is hydrophobic with the lipid hydrocarbon chains in contact with hydrophobic regions on the protein surface or penetrating into the protein interior and electrostatic interaction between charged groups on the protein surface and the lipid head groups. Although a lot of studies are focused on the structure of biomembranes, the organization of lipid molecules in biomembranes has not been fully determined. In order to resolve more extensively the interaction between lipids and proteins, it was investigated by differential scanning calorimetry (DSC) in model membrane systems.

The effect of electrostatic interaction between basic polypeptides (polylysine and polyarginine) and acidic phospholipids (phosphatidylserine and phosphatidic acid) was examined by DSC. Polylysine raised the phase transition temperature of dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) by 5 degrees. On the other hand, polyarginine lowered the phase transition temperature of DPPS by 6 degrees. The same effects was observed in dimyristoyl phosphatidic acid (DMPA) and dipalmitoyl phosphatidic acid (DPPA).

Melittin is a major component of bee venom and consists of 26 amino acids starting with predominantly hydrophobic amino acids in the N-terminal part and finishing with charged and hydrophilic residues in the C-terminal part. DSC studies revealed that melittin was able to induce membrane fusion between neutral phospholipids and acidic phospholipids.

1　緒　言

コスメトロジーは生物・医学・生理学の観点からは多細胞生物の表皮細胞上での作用を扱っており、背景として生命の基本単位である細胞についての理解が必要となる。実際に、構造から機能まで生物の基本要素のすべては細胞に存在しており、さらに、その環境として水の重要性が指摘できる。細胞を構築している膜構造は「生体膜」と呼ばれ、重要な生物機能が行われる場である。生体膜の主要な成分は蛋白質と脂質であり、水中で自発的に集合して膜構造を形成する脂質分子にその基本構造は依存している。生体分子の中で、蛋白質、核酸、糖質はユニットとなる分子が重合した生体高分子であるのに対して、脂質は低分子（リン脂質で分子量が1000程度）であるが、その分子構造に由来する両親媒性から水中で分子集合体を形成して膜構造となる特徴をもっている。これは多様な構造と物性を生じさせ、蛋白質との相互作用を通して、細胞膜の機能を制御するだけでなく、生物の環境適応にも重要な役割を果たしている[1]。

また、生物は進化の過程で、生命の誕生した水中から陸上に移行したのであり、そのとき以来、表皮細胞により、体細胞を本来の水環境と同様な環境に維持してきた。つまり、脂質は気液界面での物性および水和現象を介して、コスメトロジーに深く関連している。そこで、細胞膜の脂質について、その物性を詳細に研究し、コスメトロジーの発展と新たな展開を可能とする基礎的な知見を得

Basic Study on Physical Property and Function of Cellular Membrane Lipids
- Application of Physical Property of Phospholipids to Cosmetology -

Kazuo Ohki

Tohoku University
Graduate School of Science

ることを目的とした研究を実施した。

具体的には、可能な限り多くの脂質分子種について、脂質2分子膜の相転移、相分離、流動性などの諸物性を測定するとともに、その水和過程についても検索し、各種のイオン、薬物、ペプチドなどが物性に及ぼす影響を調べ、コスメトロジーに有用な物性を明らかにすることを試みた。

2 リン脂質2分子膜の構造と相転移

リン脂質は主要な膜脂質であり、生体膜の形成に重要な役割を担っている両親媒性の分子である。多様な分子種が存在するが、共通な構造として親水性の極性頭部と疎水性の脂肪側鎖をもっている(Fig. 1)。

この性質により、水中では熱力学的な平衡状態として自発的に分子集合体であるリン脂質2分子膜を形成する。これが生体膜の基本構造となる脂質二重層膜であり、領域を区画するだけでなく、相転移・相分離・流動性・選択透過性など種々の物性を示す。これにDNAの遺伝情報に従って合成された蛋白質が結合したものが生体膜であり、細胞を構築するとともに重要な生物機能の場でもある。

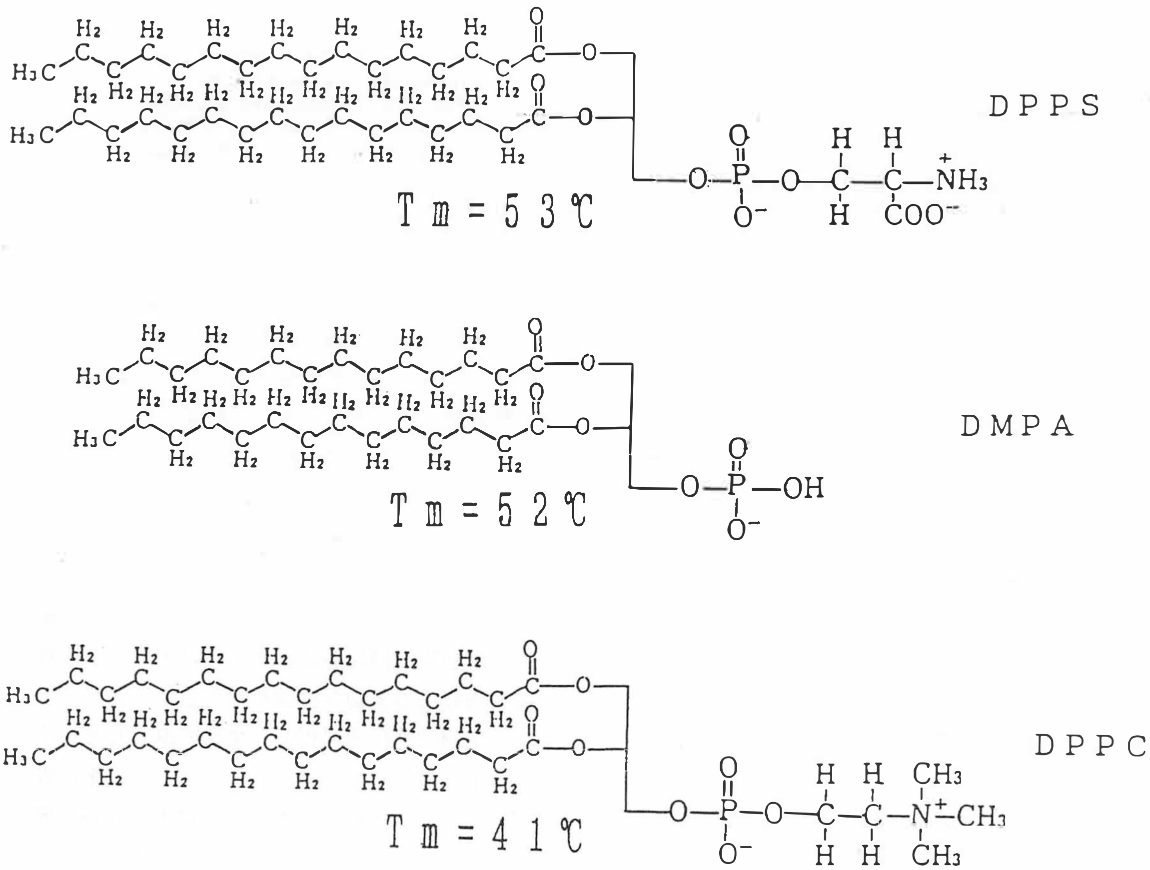

Fig. 1 Chemical structures of phospholipids
DPPS: dipalmitoylphosphatidylserine. DMPA: dimyristoyl phosphatidic acid. DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine.
DPPS and DMPA are acidic phospholipids, and DPPC is a neutral phospholipid.
Tm indicates main phase transition temperature of each phospholipid.

種々の物理的または化学的な因子は生体膜の構造と物性を介して生体膜の機能に反映している。脂質膜の熱物性を示差走査熱量計（DSC＝Differential Scanning Calorimeter）で測定すると、構成する分子種およびその組成、また、膜内での分布状態に依存した相転移が観察される。これは膜に作用する物質の影響を受けるので、脂質膜の相転移挙動を解明することは、生体膜の基本的な物性の知見を得ることになる。

脂質二重層膜は液晶のスメクティック相に類似の構造であり、熱誘起型の相転移（thermotropic phase transition）を示す。リン脂質分子の脂肪酸部分は炭化水素鎖であり、相転移の主転移はこのall-trans構造にC-C結合間の異性化回転運動が始まり、gauche結合が現われるchain-meltingである。さらに、リン脂質分子の極性頭部に依存して、主転移の他にもいくつかの熱誘起型相転移を示す。代表的な合成リン脂質であるジパルミトイルホスファジルコリン（DPPC）では低温側から、結晶相（Lc）、ゲル相（Lβ'）、リップル相（Pβ'）、流動相（Lα）の相構造を取る（Fig. 2）。

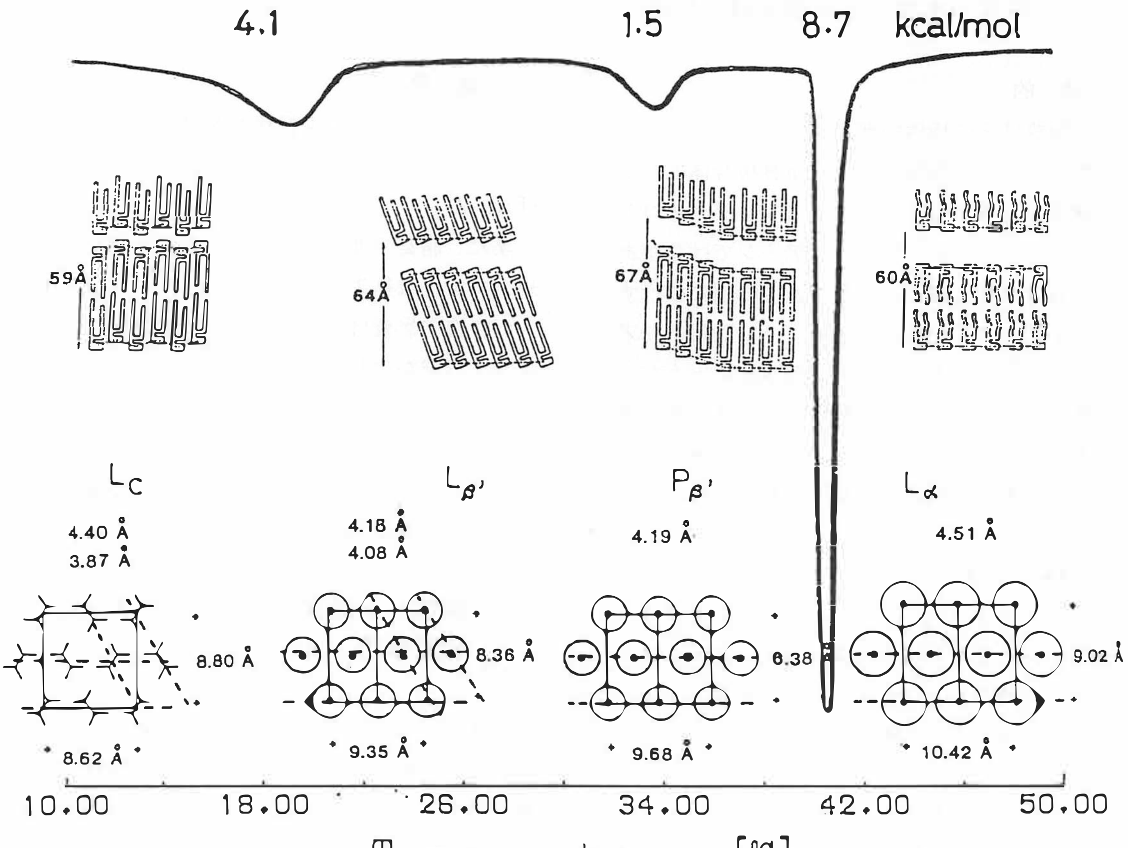

Fig. 2 Thermogram and unit structure of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) membrane
Top: thermogram measured by DSC.
Middle: arrangement of phospholipid molecules (side view)
Bottom: Unit structures obtained by X-ray diffraction (top view)
Lc, Lβ', Pβ', Lα indicate crystal phase, gel phase, ripple phase and fluid phase, respectively.

ここで、ゲル相と流動相の間の主転移が脂肪側鎖の融解に相当しており、この相転移に伴う物性の変化がもっとも顕著である。

リン脂質二重層膜の相転移温度はその分子種で決定し、極性基部分が共通であれば、その脂肪側鎖の種類によっている。脂肪側鎖に不飽和結合として、二重結合を導入すると脂質分子の充填構造を崩すために、分子間のファンデルワールス引力を低下させ、相転移温度が低下する。二重結合は折れ曲がるcis型の方が直線のtrans型よりも大きく転移温度を降下させる。

3 リン脂質の水和による脂質膜の形成

3.1 目　的

リン脂質はその極性頭部が水和することで水中に分散し、その両親媒性により脂質集合体としての膜構造を形成する。水和はホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンでは差があり、後者は水和し難く、主転移と協同的に進行することが知られている。そこで、リン脂質の粉末に水を添加し、種々の条件下での水和にともなう膜形成（ミエリン形成）と相転移の関係を光学顕微鏡下に観察し、これより分子レベルの条件とマクロな分子集合体構造との相関を検索する。

3.2 材料と方法

[材料]ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）はシグマ社から購入した。

[方法]ニコンBiophotoノマルスキー微分干渉顕微鏡に浜松ホトニクスCCDカメラセット C3077CCDカメラを接続し、画像処理システム {ビデオテープレコーダーSONY SLV-SR7、RGB カラーモニター SONY PVM-1444Q、カラービデオプリンター SONY UP-1800、Apple マッキントッシュ Quadra840AV、カラーモニターICMLS-2617FN、Appleマッキントッシュ Quadra610、光磁気ディスク コバルCS-M120W、カラープリンター YHPデスクライター550C、レーザープリンター 沖 MICROLINE800PSIILT、カラーイメージスキャナ エプソン GT-6500、8ミリビデオカメラ ソニーCCD-TR3} で解析した。温度制御は顕微鏡用ウォームプレートを用い、温度測定はマルチ温度計 アドバンテストTR2114で行った。

窪みをもつスライドガラスに脂質の粉末を取るか、脂質の薄膜を形成し、水または緩衝液の数滴を滴下し、温度変化による脂質の変化の様子を顕微鏡で観察し、ビデオに録画して解析した。

3.3 結　果

DPPCの粉末はその主転移温度以上になると水和過程が進行し、ミエリン形成が観察された(Fig. 3)。

また、脂質の薄膜を形成して水和させたときは、以下のような結果を得た。DPPCはカルシウムイオンの存在の影響は受けずに、主転移温度以上でミエリン形成が生じ多重層ヴェシクルが生じた。DPPE、DMPEではミエリン形成の直後に集合して凝集塊となった。DPPA、DPPGなどの酸性リン脂質ではコントラストが低く積層数の少ない多重層ヴェシクルが形成された。

4 酸性リン脂質と塩基性ペプチドの相互作用

生体膜では、内在性膜蛋白質は疎水性相互作用で、表在性膜蛋白質は静電相互作用で脂質二重層膜に結合している。そこで、この相互作用の基本的な様式を脂質の相転移を利用して塩基性ペプチドとホスファチジルセリンの系で調べた。ポリリジンはジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）の相転移温度を上昇させたのに対して、ポリアルギニンは低下させた。これらの相転移挙動の変化はそれぞれのペプチドに特徴的であり、その解析により相互作用の様式を推測した。

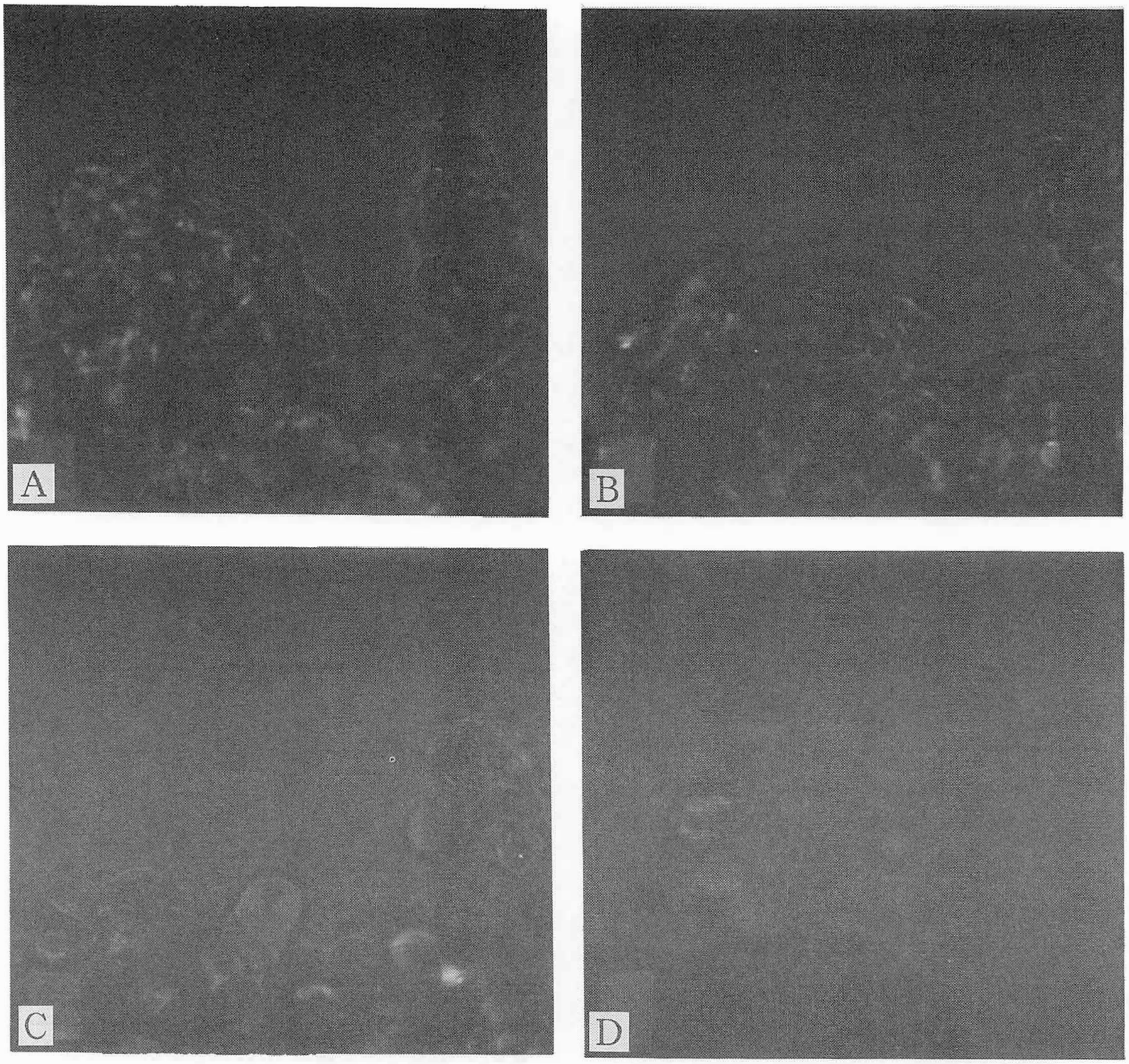

Fig. 3 Hydration of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)
The hydration process is accompanied with phase transition.
A: Below the phase transition temperature.
C: Avove the main transition temperature, hydration was proceeding.
B:Above the main transition temperature, hydration process just started.
D:Above the main transition temperature, the hydration was completed.The hydration process was observed by an optical microscope, and the process was recorded on a video tape.

4.1 目 的

生体膜には正味に中性なリン脂質に加えて負電荷が残る酸性リン脂質が存在し、膜蛋白質との静電的な相互作用を介して、その機能に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、このような蛋白質に含まれ正電荷をもつ塩基性アミノ酸のリジンとアルギニンのポリマーを用いて、ホスファチジルセリンとの静電的な相互作用について、DPPSの相転移挙動の変化を示差走査熱量計(DSC)で測定することで検索した。

4.2 材料と方法

［材料］DPPS(DL-dipalmitoylphosphatidyl-L-srine)、ポリリジン(poly-L-lysine；平均重合度=120)、ポリアルギニン（poly-L-arginine；平均重合度=215)はいずれもSigma社より購入した。これらの化学構造をFig. 4に示す。

［リポソームの調製］脂質のクロロホルム溶液をガラス容器に取り、窒素気流下、さらに減圧下に溶媒を留去し、内壁に脂質の被膜を作る。これに緩衝液（HEPES 50mM；pH7.4）を加えて、浴槽式超音波発振機で80℃、2分間の処理によりリポソームを調製した。

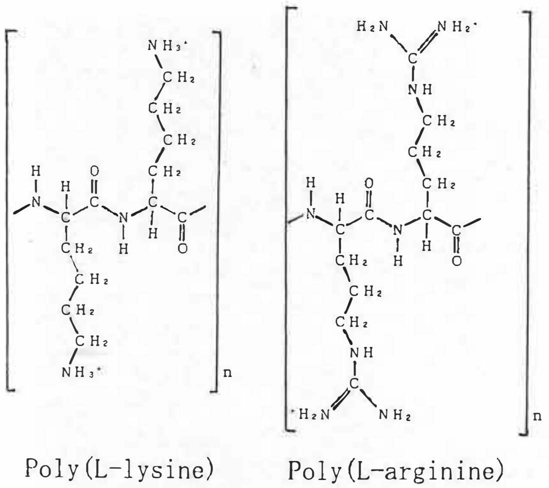

Fig. 4 Chemical structure of poly (L-lysine) and poly (L-arginine) Average numbers of polymerization are 120 and 215 for poly (L-lysine) and poly(L-arginine), respectively.

［DSC測定］0.5mlの試料を用い、プリバロフ断熱型高感度微小示差走査熱量計DASM-4により、昇温速度0.5K／minで測定し、サーモグラムを得た。試料液内の発泡を防ぐためには窒素で2気圧に加圧した。

4.3 結　果

酸性リン脂質のDPPSのリポソームはEDTAの存在下では52.6℃と53.9℃に明瞭に分離した相転移ピークをもつサーモグラムを示した。DPPSリポソームにポリリジンを添加すると、54℃付近に転移ピークが現われ、ポリリジンのDPPSに対する電荷比が 0.15、0.25、0.5、0.75と増加すると、このピークが成長し、本来のピークは減少した(Fig. 5)。

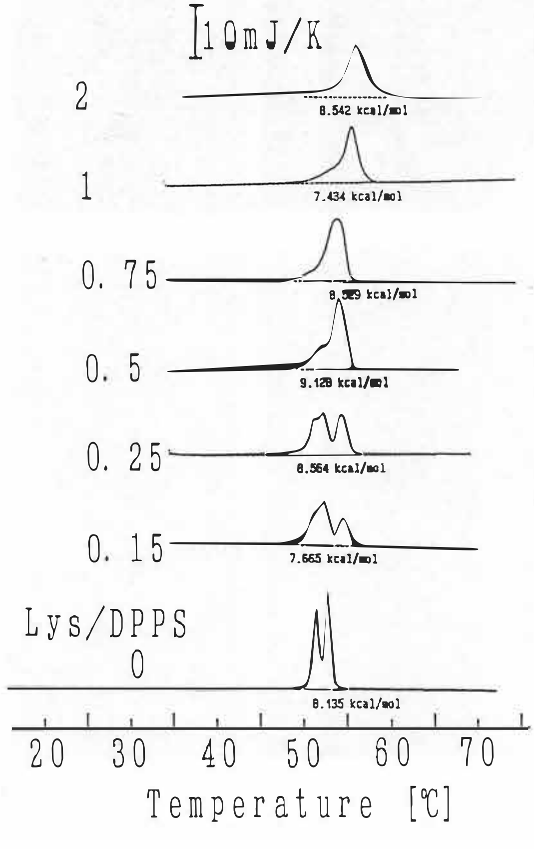

Fig. 5 Effect of poly(L-lysine) on thermograms of dipalmitoylphosphatidylserine DPPS liposomes were prepared by dispersing 2μmol phospholipid in HEPES buffer (50mM HEPES, 5mM EDTA；pH7.3) containing desiredamount of poly (L-lysine) at 80℃.
The numbers indicate molar ratio of L-lysine residue to DPPS.
Thermograms were obtained after the incubations at a heating rate of 0.5K/min.

これはDPPSにポリリジンと結合した領域と結合していない領域があり後者の領域が拡大していく

と理解できる。電荷比が1になるとそのピークは57℃に移行し、電荷比2ではさらに58℃へと上昇した。一方、ポリアルギニンの添加ではまず電荷比0.15でわずかな転移の上昇があり、0.60まで降下して52℃付近のピークとなった。さらに、ポリアルギニンを増し、0.65を越えると49℃付近のピークが成長して52℃のピークと置き換わり、0.90からは、さらに転移温度が降下し48℃となった(Fig. 6)。

4.4 考 察

DPPSは酸性リン脂質であり生理的な条件下で負電荷をもつ。そのためカチオンの影響を受け易く、緩衝液に含まれる微量の2価金属イオンのために幅の広い相転移を示す。EDTAを加えて金属イオンを除去すると先鋭な転移ピークとなるだけでなく、近接した2本の相転移ピークとなる。これらはpHに依存して転移温度を変えたことからDPPSの極性頭部の異なる解離状態による分裂と推測される。

酸性リン脂質であるホスファチジン酸およびホスファチジルグリセロールに及ぼすポリリジンの影響と比較して、今回のDPPSに対する効果を考察する。ポリリジンをジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）にアミノ酸残基と脂質の電荷比1で添加したときは、その相転移温度を20度上昇させていた。DPPSではその上昇はおよそ5度に過ぎず、これはホスファチジルグリセロール（DPPG）に添加した場合の相転移温度の上昇に等しい。ポリリジンを添加すると高温側に転移ピークが現われ、添加量に比例して本来のピークが減少し、高温側のピークが成長するのはDPPAの場合と一致している。X線回折による研究ではDPPAの多重層膜の膜間にポリリジンがβ構造を取って入り込んだ構造が得られており[2)]、DPPSではαヘリックスを取っているために、脂質とペプチドの相互作用が弱いと推測できる(Fig. 7)。

また、ポリリジンの脂質膜上の構造はDPPGではαヘリックスとβシートの共存であると報告されており、αヘリックスは二重層膜内の脂質分子の配列および分子運動に対する束縛が小さいと想像される。

ポリアルギニンの酸性リン脂質膜上の構造は不

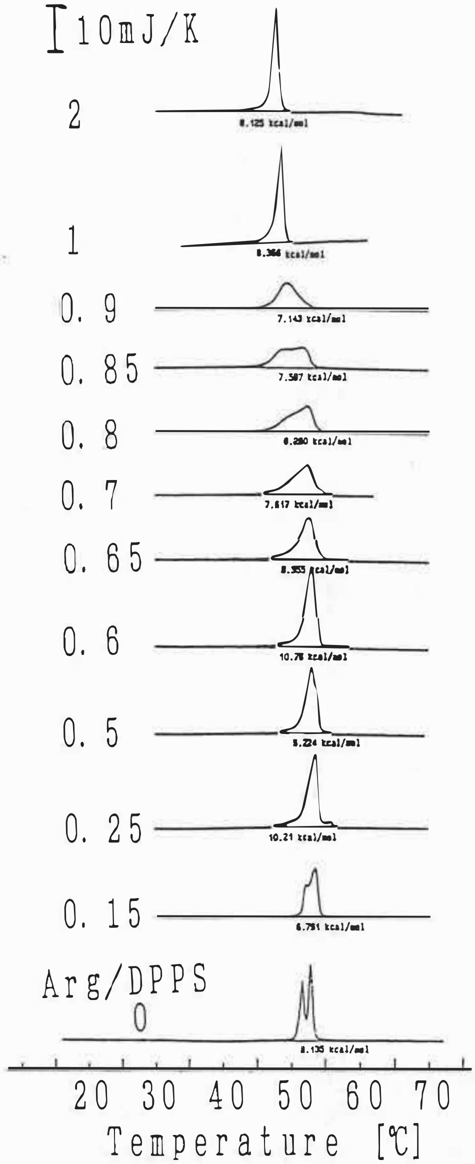

Fig. 6 Effect of poly(L-arginine) on thermograms of dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS)
DPPS liposomes were prepared by dispersing 2μmol phospholipid in HEPES buffer (50mM HEPES, 5mM EDTA; pH7.3) containing desired amounts of poly (L-arginine) at 80℃.
The numbers indicate molar ratio of L-arginine residue to DPPS. Thermograms were obtained after the incubations at a heating rate of 0.5K/min.

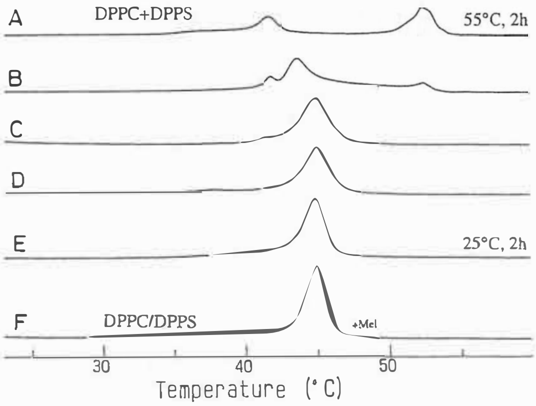

Fig. 7 Membrane fusion detected by change in DSC thermograms
DPPC liposomes were prepared by (50mM HEPES, 5mM EDTA ; pH7.3) containing (A)0mM, (B)0.02mM, (C)0.04mM, (D)0.06mM and (E)0.06mM melittin.
In the absence of melittin, DPPS liposomes were prepared in the same method. DPPC and DPPS liposomes were mixed and incubated for 2h at (a)-(d) 55℃ or (e) 25℃. (F) Liposomes of equi molar mixture of DPPC and DPPS were prepared in 0.06mM melittin at 80℃.
Thermograms were obtained after the incubations at a heating rate of 0.5K/min.

明であるが、相転移温度を低下させることから、膜内脂質分子のパッキングを緩和させるような構造と相互作用を考える必要がある。

これらの結果は、脂質と蛋白質の相互作用にアミノ酸構成による特異性が存在することを示唆するとともに、生体膜における蛋白質の機能発現の機構に静電的な相互作用を介した脂質の関与があることを示している。

5 蜂毒メリチンによる酸性リン脂質膜と中性リン脂質膜の膜融合

塩基性アミノ酸残基と疎水性領域をもつペプチドである蜂毒メリチンは、酸性リン脂質と中性リン脂質の間の膜融合を惹起することを示差走査熱量計（DSC）を用いた実験で示した。これは、細胞の分泌顆粒の膜にホスファチジルセリンが含まれることや、細胞が刺激を受容したときホスファチジン酸を生成することから、細胞内に塩基性アミノ酸と疎水性領域をもつ蛋白質を介した膜融合が誘起される可能性を検討したものである。

5.1 目　的

膜融合は細胞の共通かつ基本的な機構として、細胞分裂、分泌、エンドサイトシス、ウィルス感染など生体膜の再配列が関与した種々の生物機能に存在している。また、細胞がレセプターを介して外部の刺激を受容すると、脂質代謝が促進され、ジアシルグリセロールキナーゼおよびホスホリパーゼDの活性化によりホスファチジン酸が生成する。一方、細胞外からホスファチジン酸を添加すると、繊維芽細胞の増殖を誘導することが示されており[3]、さらに、好中球、血小板、肝細胞、内皮細胞など多くの細胞でもアゴニスト刺激によりホスホリパーゼDが活性化されることが明らかになっている。しかし、刺激に応答した細胞で、脂質代謝の促進により生成するホスファチジン酸の役割については、まだ未知であり、その解明が重要な研究課題となっている。ホスファチジン酸の役割についてはCa_2^+イオノフォア活性を示すことを人工膜系において報告している[4]が、細胞内での生理的な条件下での活性は確認できていない。酸性リン脂質を含む脂質膜がCa_2^+で融合することは、ホスファチジン酸やホスファチジルセリンなどについてリポソーム系の実験ではよく研究されているが、実際に細胞内でこの機構が作用していることの証明はまだ充分ではない。これに対して、蛋白質による膜融合の機構は解明が進展している。そこで、ホスファチジン酸の役割として、細胞内に塩基性アミノ酸残基と疎水性領域をもつ蛋白質またはペプチドが存在したときに膜融合を誘起するとの仮定のもとに、中性リン脂質のホスファチジルコリン(DPPC)と酸性リン脂質のホスファチジルセリン(DPPS)およびホスファチジン酸(DMPA)でリポソームを調製し、蜂毒メリチンを塩基性アミノ酸と疎水性部位をもつペプチドとして用い、断熱型高感度示差走査熱量計(DSC)で測定した相転移挙動の変化により膜融合を検索した。

5.2 材料と方法

ジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジミリストイルホスファチジン酸（DMPA）、メリチン(純度85%）はSigma社より、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）は日油リポソームより購入した。リポソームは、脂質で被膜した試験管に脂質濃度が2mMになるように緩衝液（HEPES 50mM, pH7.4；EDTA 5mM)を加え、浴槽型発振器により70℃で2分間、超音波処理して調製した。EDTAはメリチンに含まれるホスホリパーゼ活性を抑制するために加えてある。

示差走査熱量測定は、プリバロフ断熱型高感度微小熱量計（DASM-4）を用いて、昇温速度0.5K／minで行った。試料液の発泡を抑えるために2気圧に加圧した。

5.3 結果と考察

一般にリン脂質は水に分散させると自発的に膜構造を取り、極性頭部と脂肪酸側鎖の組合せで決定する分子種に依存した温度で相転移を示す。

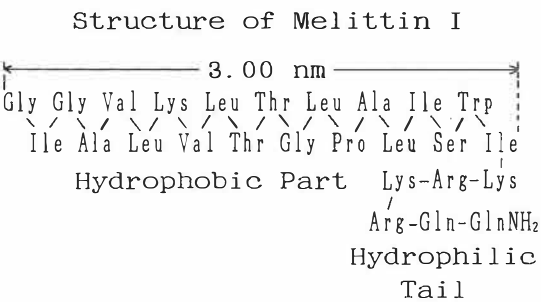

Fig. 8 Chemical structure of bee venom melittin

一方、蜂毒のメリチンはFig. 8に示すように、26残基で構成されるペプチドであり、アミノ末端から20残基でαヘリックスを形成させると疎水的なアミノ酸が片側に集中している。また、カルボキシル末端には塩基性アミノ酸のリジン(Lys)とアルギニン（Arg）が2残基ずつあり、正電荷を帯びている。したがって、メリチンの疎水性領域がDPPCと疎水的な相互作用を、塩基性アミノ酸残基が酸性リン脂質の負電荷と静電的な相互作用し、両リポソームの膜融合を誘導するものと予測して実験を実施した。この予測を支持する報告もあり、酸性リン脂質のカルジオリピンを30mol%含むリン脂質のリポソームは、$Ca_2{}^+$で融合させるには10mM以上の濃度が必要であるのに対して、メリチンではμMのオーダーでよいことが示されている[5]。

DPPCは42℃、DPPSは53℃付近で脂肪酸側鎖の融解による相転移、つまり、主転移を示す。

また、DPPCとDMPAを混合した状態で水に分散させると、そのリポソームは DPPCとDPPS の miscibiltyに依存した脂質２成分系（binary mixture）の相図（相転移と相分離）を示すことになる。

DPPCとDPPSの組合せはmiscibilityが高いので、一つの相転移を与える。そこで、DPPCとDPPSの各脂質成分でリポソームを別々に調製して混合した系では、膜融合のないとき各成分の相転移が維持され、膜融合が生じたとき一つの相転移となる。

したがって､示差走査熱量計（DSC）でこれらの系の相転移挙動を測定すれば膜融合の進行を検索できる。

それぞれ、独立に調製したDPPCとDPPSのリポソームを混合して、55℃で２時間インキュベートしたとき、42℃付近と52℃付近に相転移のピークが観察される（Fig. 7A; DPPC＋DPPS)。この相転移のプロファイルはDPPCとDPPSの単純な重ね合わせに近いものであり、それぞれの転移は分離して観察されている。このことはDPPCとDPPSの間に膜融合が生じていないことを示している。また、全てのリポソームが膜融合したときに得られるサーモグラムとして、DPPCとDPPSの混合脂質から３モル%のメリチン存在下で調製したリポソームの相転移挙動を示してある（Fig. 7F; DPPC／DPPS)。

メリチンによるDPPCとDPPSの膜融合は、先にDPPCのリポソームにメリチンを添加し、これにDPPSリポソームを混合してインキュベートしたとき効率的に進行した。このような系での実験結果がFig. 7B-Eに示してある。添加したメリチンの濃

度に依存して膜融合により生じるDPPC／DPPSの２成分混合系の相転移ピークが45℃付近に現われた。３モル％になると、その転移ピークは完全な膜融合が生じたときのサーモグラムであるFig. 7Fの相転移ピークとほぼ一致しており、DPPCとDPPSの膜融合が完了していることを示した。一方、インキュベーションの温度をDPPCおよびDPPSがともにゲル相にある25℃に低下させても（Fig. 7E)、55℃のサーモグラムと差のない結果が得られており、この膜融合は脂質膜の相構造には依存しないことも示された。

酸性リン脂質をDMPAに置き換えた系で同様な実験を実施したが、その結果は、DPPCとDPPSの場合とほとんど一致していた。

これらの結果は、PSを含む細胞の分泌顆粒の形質膜との膜融合にカルシウムイオンだけでなく蛋白質またはペプチドが関与している可能性だけでなく、刺激を受容した細胞内に生成するホスファチジン酸がペプチドまたは蛋白質の介在のもとに、細胞内での膜融合現象を惹起している可能性も示唆している。

6 総 括

コスメトロジーがヒト表皮の細胞を対象としている限り、細胞を構築する生体膜への作用を考慮せざるをえない。ここでは、生体膜の主要な構成成分である脂質と蛋白質に注目して、その基本的な物性についての研究を行った。とくに、生物に必須な水との関係を重視し、脂質の水和についての研究も実施した。生体膜は生物機能が行われる場であり、この機能が物性の影響で変化することは一つの機能制御の機構と考えられる。そこで、この観点からリン脂質の物性の解明がコスメトロジーへの応用の端緒を開くものと期待したい。

文 献

1. 野澤義則、大木和夫「生体膜のバイオダイナミクス」羊土社、1993
2. Takahashi H., Matuoka S., Kato S., Ohki K., and Hatta I., *Biochem. Biophys. Acta.*, **1069** 229-234 (1991)
3. Moolenaar W. H., Kruijer W., Tilly B. C., Verlaan I., Bierman A. J. and de Laat S. W. *Nature.*, **223** 171-173 (1986)
4. Ohki K., Nagaoka S., Sogami M. and Nozawa Y. *Biochem. Biophys. Acta.*, 39 237-249 (1986)
5. Eytan G. D. and Almary T. *FEBS Lett.*, **156** 29-32 (1983)