

甾体激素受体的活化作用

杨常仁 袁玉萍

(中国科学院,上海生物化学研究所)

甾体激素作用的生化过程,首先是与细胞浆中称为受体的专一性蛋白结合,生成激素-受体复合物。在生理温度下,此复合物经过称为“活化”(activation)的作用过程之后,再移位(translocation)至细胞核内,与染色质作用,调节基因的转录,产生生物学效应^[1]。由此可见受体的活化在激素作用过程中是重要的中间步骤。体外实验证明,在0°C条件下,受体也能与激素结合,但却不能转位至细胞核内,这表明受体与激素的结合和活化,是先后发生的两个步骤。受体活化后性质发生多方面的改变。活化的受体能与细胞核或细胞核组分(DNA或染色质)结合,而未活化的受体一般都不能;活化受体与DNA-纤维素,磷酸纤维素或ATP-Sepharose等多聚阴离子也有亲和力,因而可用这些多聚阴离子测定活化的受体。受体活化后,分子大小也会发生改变。小鸡输卵管系统的孕激素受体的活化,总伴随着沉降系数由~8S至~4S的转变。在雌激素与糖皮质激素受体中,沉降系数的改变,可能是继活化之后的另一过程^[2]。本文把受体沉降系数的变化,称为“转化”(transbormation),而“活化”则是指与细胞核或多聚阴离子亲和力的增加。受体活化后,与配基的亲合力也明显增加。

在无细胞系统中,温度、高离子强度、高pH及稀释等,都能使激素-受体复合物活化。不久前,我们报道肝素或0.3M KCl,能使小鸡输卵管胞浆制剂中的孕激素受体,在无内源与外源激素存在的条件下,由~8S转化为~4S,这表明在非生理条件下,受体的活化并非依赖于激素的存在^[3]。本文将对近几年,我们研究小鸡输卵管孕激素受体活化的结果,作一综述。并

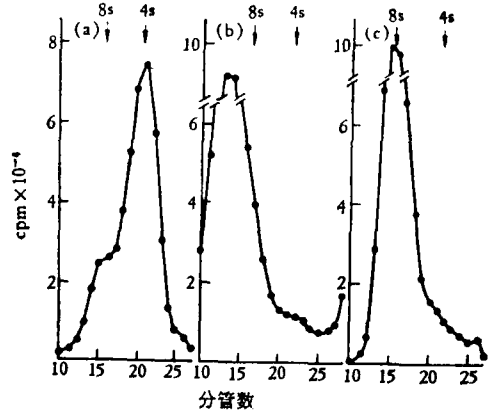


图1 温度对小鸡输卵管孕激素受体沉降系数的影响

胞浆制剂用TE缓冲液(Tris 10mM, EDTA 1.5mM, 硫甘油 12mM, 甘油 10%) (1a)或TEM缓冲液(TE + 50mM 钼酸钠) (1b和1c)制备。³H-孕酮标记,并经25°C保温1小时, PCC吸附除去游离激素。作蔗糖密度梯度超离心分析。5—20%的蔗糖溶液用TE(1b)或TEMK (TEM + 0.15M KCl) (1a和1c)配制。以葡萄糖氧化酶作为内标准蛋白。

对活化机制进行讨论。

(一) 温度的活化作用 小鸡输卵管胞浆制剂,与³H-孕激素经25°C保温1小时后,作蔗糖密度梯度超离心分析,证明激素-受体复合物已由~8S转变为~4S形式,钼酸钠明显地抑制这种转变(图1)。温度引起的受体沉降系数的改变,与保温时间有关,从图2可见,随保温时间的增长~8S组分逐渐减少,~4S组分逐渐增加,至1小时,绝大部分受体都为~4S形式。平行实验证明,随保温时间的增加,与磷酸纤维素结合的受体量也增加,与配基解离速度减慢^[4],表明由温度引起产生的~4S形式,是受体活化形式。

激素-受体复合物解离动力学研究的结果表明,温度活化的受体与钼酸钠稳定的未活化

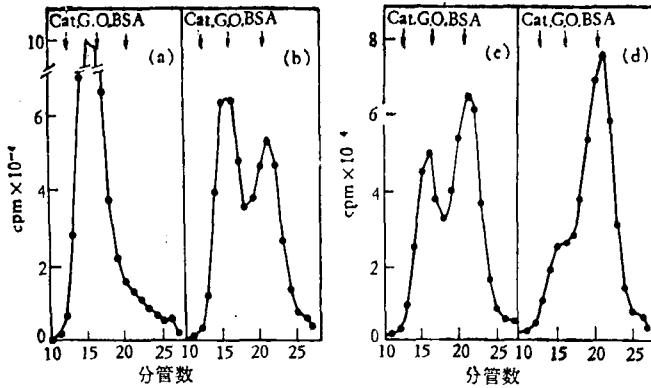


图2 保温时间对孕激素受体转化的影响

胞浆制剂用 TE 缓冲液制备,用 $[^3\text{H}]$ 孕酮标记后, 25°C 保温 0(a)、15(b)、30(c) 和 60(d) 分钟在 TEMK 缓冲系统中作蔗糖密度梯度超离心分析。内标准蛋白用箭头表示于图谱上方。cat. 促酶 G0, 葡萄糖氧化酶, BSA 牛血清白蛋白。

受体,配基解离均为一级反应,但温度活化的激素-受体复合物,解离速度较未活化受体慢 2.5 倍(图 3)。未活化的受体在无钼酸钠存在的条件下,解离动力学表现为两相,如图 3 所示,10 小时以前,曲线平行于钼酸钠稳定的受体,以后就逐渐转变为与活化受体平行。蔗糖密度梯度超离心分析表明,在解离实验初期,受体是 $\sim 8\text{S}$ 形式,而终了时,已转变为 $\sim 4\text{S}$ 形式了。此事实清楚地表明,在无钼酸钠的系统中,孕激素受体即使在 0°C 条件下,也能转变为活化形式^[3]。

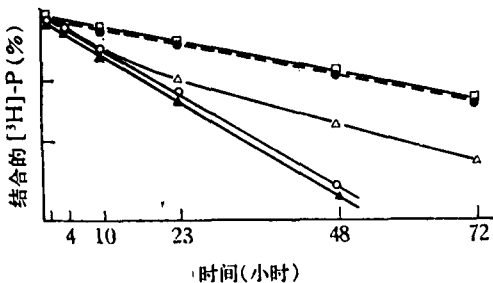


图3 $[^3\text{H}]$ -孕酮-受体复合物的解离动力学

制备胞浆制剂的缓冲液与标记受体的条件:

- TE, 25°C 1小时;
- TE, 25°C 1小时; 然后加钼酸钠至 50mM、
- △——TE, 0°C 3小时;
- TEM, 0°C 3小时;
- ▲——TEM, 25°C 1小时;

解离动力学: 解离由加入非标记孕酮至 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 开始,在图中表明时间。取样测定结合的 $[^3\text{H}]$ -孕酮并以解离起始时结合的 $[^3\text{H}]$ -孕酮的百分数表示。纵坐标自下而上为 10, 20, 50, 100,

温度的活化作用,能被 5~50mM 钼酸钠抑制,而 SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- 或 CrO_4^{2-} 在 50mM 时,都不表现抑制作用^[4]。

(二) KCl 的活化作用 由图 4^[3] 可见,沉降系数为 $\sim 4\text{S}$, R_s 值为 5.2nm, 并能与磷酸纤维素结合(表 1), ^3H -孕激素与受体分子的解离也表现为活化受体的慢速度特征。

Nishigori 与 Toft 曾报道^[6], 0.3M KCl 引起的活化作用,不受钼酸钠的抑制。我们用蔗糖密度梯度超离心分析等方法研究钼酸钠的作用,得到与他们不一致的结果。20mM 钼酸钠能

表1 $[^3\text{H}]$ -孕激素-受体复合物的沉降系数、 R_s 值及与磷酸纤维素的结合百分率

	活化处理			钼酸钠稳定的激素-受体复合物
	25°C 1小时	KCl 0.3M 0°C 4小时	肝素琼脂糖凝胶层析	
沉降系数 $S_{w,20}$	3.9 ± 0.2 $n=3$	3.9 ± 0.2 $n=12$	3.8 ± 0.2 $n=4$	7.9 ± 0.2 $n=9$
转化为 4S 的百分率	80	100	100	0
流体力学半径 (R_s) nm	5.2	5.2	5.2	7.6
与磷酸纤维素结合(%)	47.4 ± 4.0 $n=3$	77.6 ± 4.9 $n=5$	77.8 ± 8.8 $n=2$	5.9 ± 1.2 $n=4$ $13.7 \pm 0.1^*$ $n=2$

* 有 KCl (0.3M) 存在的条件下, 0°C 经 4 小时保温。

有效地抑制 0.3M KCl 的活化作用(图 4)。但是此抑制作用,可因增加 KCl 的浓度而被克服。当 KCl 浓度增加到 1M 时,系统中约有 50% 的受体转变为活化的 $\sim 4\text{S}$ 形式。

取 KCl 活化的受体,在 0°C 条件下,对含有钼酸钠的 Tris-HCl 缓冲液透析,除去 KCl 后,作蔗糖密度梯度超离心分析及激素解离速度的测定,未见 KCl 活化的受体回复至未活化的形式。KCl 活化处理的胞浆孕激素受体,对胞浆制剂透析,也未能使活化作用逆向进行^[3]。

(三) 肝素的活化作用 孕激素受体无论是与激素结合成复合物或是未与激素结合的未占位受体,都能被肝素琼脂糖吸附^[4]。进而我

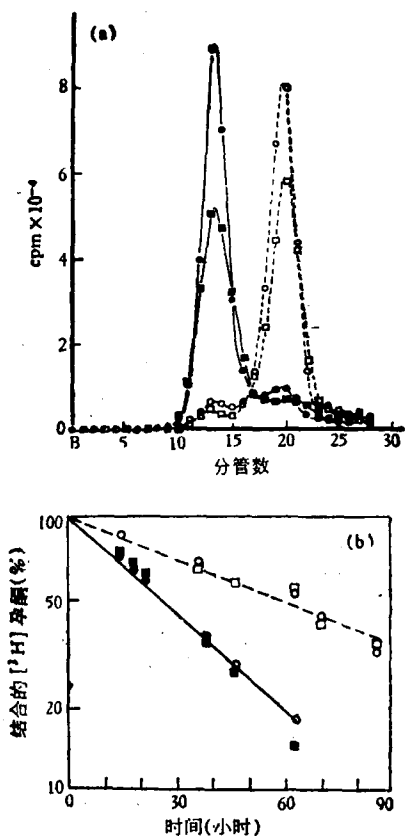


图4 KCl 与钼酸钠对孕激素受体活化作用的影响

(a) 蔗糖密度梯度超离心分析图谱,用 TEMK 缓冲液。

(b) 复合物解离的动力学图(0°C)。

胞浆制剂用 TE (虚线)或 TEM (实线)缓冲液配制。

●,○ 表示胞浆制剂先用³H]孕酮标记,后用 0.3M KCl 在 0°C 处理 4 小时;

■,□ 表示胞浆制剂先用 0.3M KCl 在 0°C 处理 4 小时,后用 [³H] 孕酮标记。

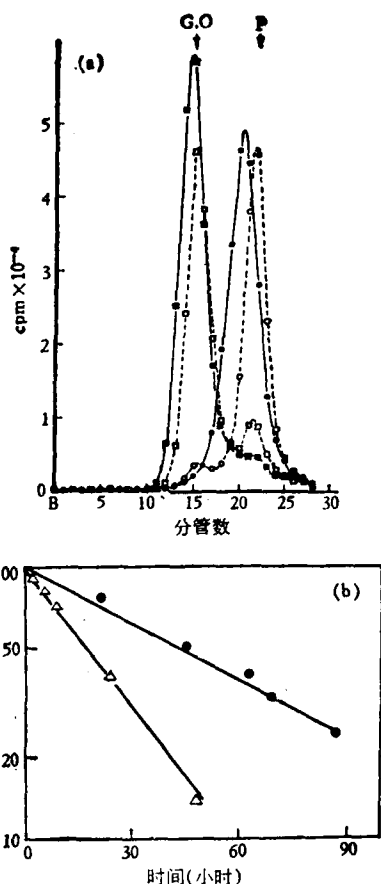


图5 肝素对孕激素受体的作用

a) 蔗糖密度超离心分析: 未经激素标记的胞浆制剂,经可溶性肝素(——)或肝素琼脂糖凝胶(----)作用后,再用³H-孕酮标记受体,并作蔗糖密度梯度超离心分析。—■—, …□… 表示反应系统中有钼酸钠存在, —●—, …○… 反应系统中无钼酸钠。

b) 复合物解离动力学: 含有钼酸钠(△-△)和不含钼酸钠(●-●)的胞浆制剂,在未用激素标记的条件下,经肝素琼脂糖柱层析,再用³H 孕激素标记, DCC 吸附除去游离的激素,在 0°C 条件下,作解离动力学分析。

们证明,如果吸附时系统中不含钼酸钠,吸附的受体即使用含有钼酸钠的 KCl 溶液洗脱,受体也表现为 ~4S 形式^[3]。未占位受体,经肝素琼脂糖凝胶层析或可溶性肝素作用后,在加入钼酸钠以停止肝素的活化作用,再用³H-孕激素标记受体,作超离心分析及解离动力学分析,证明此种经转化后再标记的激素-受体复合物,具有活化受体的特征(表 1, 图 5)。钼酸钠能抑制肝素的活化作用。

可溶性肝素使受体由 ~8S 形式转变为 ~4S 的作用,与肝素浓度有关, 0.5mg/ml 时就达到最大的作用程度。肝素的活化作用,表现

为表现一级反应动力学(图 6)。这表明受体活化是单分子反应,不需其它细胞组分参加反应。

(四) 磷酸吡哆醛 (PLP) 对受体的作用

PLP 是专一作用于蛋白分子中赖氨酸的 ε-氨基(或肽链 N-末端氨基)的化学改性试剂。反应式如图 7 所示。PLP 的醛基作用于蛋白分子中的氨基,形成 Schiff 碱,此反应是可逆的,但经硼氢化钠还原后,就生成稳定的 PLP-蛋白质衍生物。近年来 PLP 已用于研究多种甾体激素受体的物化性质^[7-10], 我们则利用这一试剂

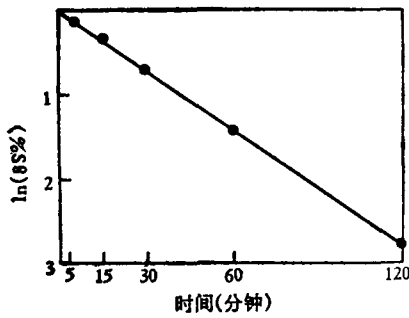


图6 肝素使孕激素受体由8S→4S的转化程度与反应时间的关系

³H孕激素标记的胞浆制剂,与肝素(0.5mg/ml)在0℃保温不同时间,加入钼酸钠至20mM。受体转化的程度,用蔗糖密度梯度离心测定。8S形式受体占孕激素-受体复合物的百分数,用自然对数表示并对反应时间作图。得直线关系,表明反应是表现一级反应。

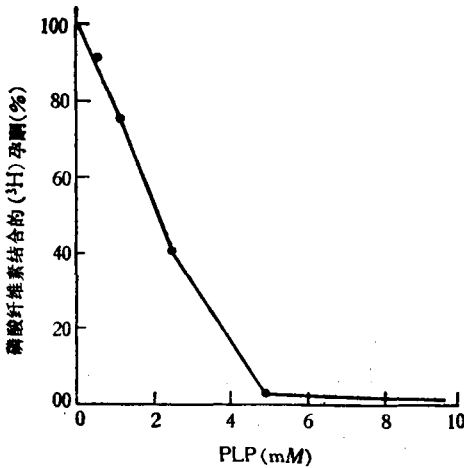


图8 不同浓度 PLP 抑制孕激素-受体复合物与磷酸纤维素的结合。

[³H]孕酮标记的胞浆制剂与不同浓度的 PLP 在0℃保温30分钟,并经硼氢化钠还原,测定与磷酸纤维素的结合率。

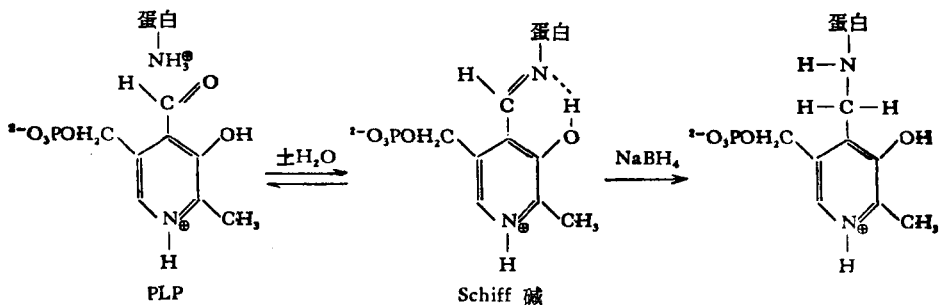


图7 磷酸吡哆醛与蛋白分子中氨基酸残基的ε-氨基或N-末端氨基化学反应式

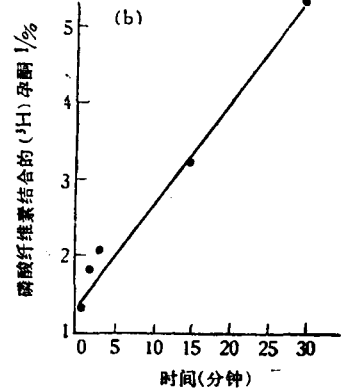
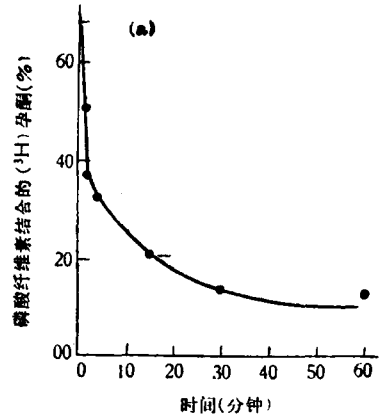


图9 PLP 的作用时间对孕激素受体复合物与磷酸纤维素结合的影响

(a) [³H]孕酮标记的胞浆制剂与 PLP (5mM) 0℃反应不同时间后,加入硼氢化钠,再测定与磷酸纤维素的结合率。(b) 图(a)中与磷酸纤维素结合百分率的倒数对时间作图。得直线表明为二级反应。

的选择性作用,研究与活化有关的问题^[11]。

(1) PLP 对活化受体的作用: ³H-孕激素-受体复合物,经 KCl 活化处理后,与不同浓度的 PLP 反应,再用硼氢化钠还原,最后检测与磷酸纤维素的结合量。从图8可见,PLP 抑制活化孕激素受体与多聚阴离子的结合,与 PLP

浓度有关, 5mM 达到最大的抑制程度, 抑制作用表现为二级反应动力学 (图 9)。

如表 2 所示, 经 PLP 处理的反应物, 如未经硼氢化钠还原, 直接测定其与磷酸纤维素的结合能力, 结合百分数比经硼氢化钠还原的结果高一倍。如经 PLP 作用后, 再用 NH_2OH 处理以除去 PLP, 结合率可增加至 56%。这表明, 只要 PLP 与受体未形成共价键结合, PLP 的抑制作用是可以逆转的。测试了几种 PLP 类似物, 除磷酸吡哆胺有微弱的抑制外, 盐酸吡哆醇与盐酸吡哆醛均无抑制作用。

表 2 活化孕激素受体经 PLP 作用后作磷酸纤维素柱分析*

	PLP—NaBH ₄		PLP		PLP—NH ₂ OH	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
总 cpm	71039	100	70316	100	72493	100
流出部分	58063	82	45112	64	31624	44
吸附并洗脱部分	12946	18	25204	36	40869	56

* [³H] 孕酮标记的胞浆制剂, 与 0.3M KCl 在 0°C 保温 4 小时后, 分成三分:

- 1, 与 5mM PLP 保温 30 分钟。再经硼氢化钠还原;
- 2, 仅与 PLP 保温 30 分钟;
- 3, 与 PLP 保温后, 再经羟胺作用, 以除去 PLP。

表中“总 cpm”表示样品 [³H] 孕激素-受体复合物的总量, “流出部分”代表与磷酸纤维素无亲和力的复合物, “吸附并洗脱部分”, 代表与磷酸纤维素结合的部分。

(2) PLP 对未活化受体的作用: 研究钼酸钠稳定的未活化受体的作用, 有助于了解受体的活化机制。

(a) PLP 使受体转化的作用 PLP 除了能抑制受体与细胞核或多聚阴离子的结合之外, 还有使受体转化的作用。

如图 10 所示, 小鸡输卵管胞浆制剂中的受体, 在 10mM PLP 作用下, 大约有 50% 转化为 ~4S 形式, 20mM 时, 则几乎全部转化。在雄激素及糖皮质激素受体中, 如未经硼氢化钠进一步处理, PLP 转化作用是可逆的^[9,12], 然而在孕激素受体, 虽然用 Sephadex G-50 柱过滤或用 NH_2OH 处理, 除去系统中的 PLP, 形成的 ~4S 形式仍不能回复至 ~8S。根据 PLP 使孕激素受体转化不能逆转, 而抑制磷酸纤维素结合力则可以再恢复, 推测 PLP 引起孕激素受体

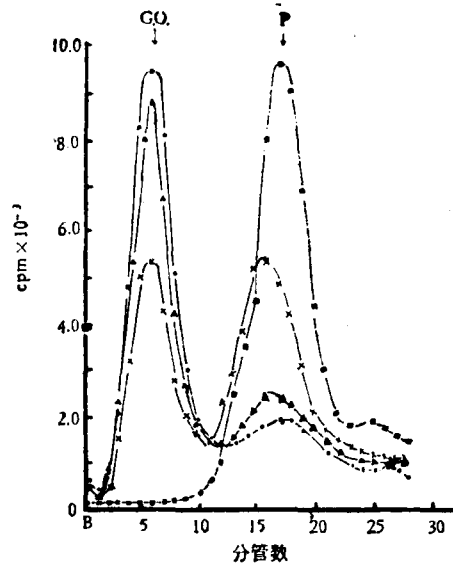


图 10 不同浓度 PLP 对孕激素-受体复合物

[³H] 孕酮标记的胞浆制剂, 经不同浓度的 PLP (—●—1mM; —▲—5mM; —*—10mM; —■—20mM) 在 0°C 反应 60 分钟后, 再经硼氢化钠还原, DCC 吸附除去游离的激素, 然后进行蔗糖密度超离心分析。内标准蛋白 GO 为葡萄糖氧化酶, P 为过氧化物酶。

转化与抑制细胞核结合的作用途径是不同的。在前一种作用中, PLP 可能只是影响了赖氨酸 ε-氨基 (或 N-末端的氨基) 的正电荷, 使与此有关的离子键断裂, 引起受体构象的改变。当构象的改变一旦完成后, 就不需要 PLP 分子的继续存在, 即使除去 PLP, 受体也不能回复至 ~8S 形式。在后一种作用中, 只有当 PLP 和受体分子保持共价或非共价键结合时, 才有抑制作用, 除去 PLP 后, 与磷酸纤维素的结合能力可以恢复。以上结果表明, 孕激素受体的转化, 以及受体与细胞核组分的结合均与赖氨酸残基有关。

(b) 未活化的孕激素受体, 经 PLP 作用后, 虽经 KCl 活化处理, 受体仍不能表现与磷酸纤维素的结合活性。

在有 20mM 钼酸钠存在的条件下, ³H-孕激素-受体复合物与 5mM PLP 在冰浴中反应 1 小时, 再经硼氢化钠作用, 形成稳定的激素-受体-PLP 三元复合物, 经 Sephadex G-50 柱以除去钼酸钠后, 再用 0.3M KCl 处理, 使受体转化为 ~4S 形式。如表 3 所示。经上述处理的

受体,与磷酸纤维素的结合能力降低了,而未经 PLP 作用的对照组,则保持很高的结合率。这表明,受体分子中与 DNA 结合活性有关的赖氨酸残基,在活化的多聚体结构中,分布在能受到 PLP 作用的分子表面。并由此推测,受体的活化,并不是靠多聚体解聚使被遮盖的结合中心暴露于分子表面,而可能是由于受体亚基本身构象的变化,从而使与 DNA 结合有关残基的空间位置改变形成有结合活性的结合中心。

表 3 未活化受体经 PLP 作用后作磷酸纤维素柱分析*

	经 PLP 修饰		对 照	
	cpm	%	cpm	%
总 cpm	8454	100	13551	100
流出部分	6384	76	4793	36
吸附并洗脱部分	2070	24	8757	64

* [³H] 孕酮标记的胞浆制剂,在有钼酸钠存在的条件下,与 5mM PLP 在 0°C 反应 30 分钟,加入硼氢化钠还原再经 Sephadex G-50 柱,除去反应液中的钼酸钠,然后用 0.3M KCl 处理,使复合物转化为 4S 形式,并分析与磷酸纤维素的结合百分率。对照组是未经 PLP 修饰的平行实验组。

(五) 受体活化机制 要阐明受体活化的机制,要了解活化与未活化两种形式受体的结构与功能,需要了解活化作用的条件和生化过程。有些实验需要用纯化的受体作为材料,并设法证明这些离体条件下的结果,与体内生理条件下的活化过程的一致性。但是迄今为止,大部分研究结果都是利用胞浆制剂取得的。目前文献中有关活化机制的论述,包括本文以下的讨论仅仅是根据活化后受体某些物化性质的改变,以及实验因子对活化作用的影响等资料,间接地对活化机制所提出的推测。

根据温度或肝素引起的活化,表现为表观一级反应的动力学的事实^[2,3],说明受体活化是单分子反应的性质,不是受体分子与其它分子或亚基的聚合作用。O'Malley 小组一系列的研究表明,小鸡输卵管孕激素受体的 A、B 两种组分经活化以后,肽链并不发生断裂。不久前,我们曾报道纯度为 ~100% 的孕激素受体,能被 KCl 等因子活化。此结果有力地支持了如下的观念:受体的活化,既不需要其它细胞组分与之

聚合,受体肽链也不发生裂解;活化是受体分子自身构象的改变^[13]。

Atger 和 Milgrom 报道^[14],糖皮质激素活化作用的热焓变化为 31 K Cal,这表明,在活化过程中,受体构象的改变,仅涉及非共价键的断裂。假设这些非共价键是离子键和氢键(键能为 5 千卡),大约有 6~7 个键的断裂。增高离子强度,促进活化,是离子强度削弱了这些与活化有关的离子键的结果。增高基质的 pH 也能促进活化的现象,说明受体分子某些带有正电荷的基团,与上述离子键有关。

关于受体的活化(指受体与细胞核组分亲和力增加的过程)与受体转化(指受体分子大小的改变,即多聚体解离或亚基的聚合作用)两者间的关系,是当前活化机制研究中的重要问题之一。如果不同甾体激素受体活化与转化有共同的规律,那么各种甾体激素受体的活化,可能有共同的机制。实际上不同受体活化与转化两者之间的关系是很复杂的而且不相一致。例如,雌激素的胞浆受体,在低盐浓度下,是未活化的 ~8S 形式,在高盐浓度下(0.3M KCl)可转变为 ~4S 形式;在温度升高时(25°C),~4S 形式的受体又与另一组分聚合成 ~5S;~4S 与 ~5S 形式两者均含有大约相等比例的活化受体^[2]。这表明,雌激素受体由 ~4S 转变为 ~5S 的过程,是发生在活化过程之后,换言之,活化与转化是先后相继发生的二个不同过程。孕激素受体的活化,却总是表现为由 ~8S 较大分子形式转变为 ~4S 较小分子形式的过程。维生素 D 受体的活化,与前两类受体均不相同,活化与未活化形式都表现为 3—3.5S。上述现象表明,各种甾体激素受体,可能各有其特殊性,并不按同一种模式进行活化。当然这并不排斥不同甾体激素受体活化过程中,有些步骤可能是相同的。如钼酸钠均能抑制或减慢多种甾体激素受体的活化过程,就表明它们活化的机制中,至少有一步是相同的,这一步均受钼酸钠的影响。

各实验室关于小鸡输卵管系统中孕激素受体结构的研究结果,虽不完全一致,但都证明含

有沉降系数为 $\sim 4S$ 的 A、B 两种亚基,其中 A 组分有一个与染色质 DNA 结合的中心,而 B 组分有一个与染色质蛋白结合的中心;单体状态,它们均能与磷酸纤维素等多聚阴离子结合,但它们的多聚体 ($\sim 8S$) 则不表现与细胞核或多聚阴离子的结合活性。根据此现象提出一种解释:在 $\sim 8S$ 的多聚体结构中, A、B 两种亚基与核组分结合的中心,由于多聚结构而被遮盖,所以是未活化形式。 $\sim 8S$ 的多聚体一旦解聚成 A、B 单体时,被遮盖的结合中心,就立即暴露而表现出活化的性质。这就是说,孕激素受体的活化过程,就是转化作用。但是我们上述 PLP 化学改性的研究却证明,即使是钼酸钠稳定的 $\sim 8S$ 多聚体结构中,与细胞核组分结合有关的赖氨酸残基,仍能受到 PLP 的修饰。说明它们并不是埋藏在多聚体的内部。从我们这一结果推测,在孕激素受体的活化过程中,除了有多聚体的解聚外,受体亚基自身的构象也发生了变化,使与核组分结合的有关基团,空间位置改变,从而形成有活性的结合中心。亚基自身构象发生改变的另一根据是,受体活化后,与激素的亲合力明显增加。我们关于孕激素受体-激素复合物解离热力学的研究证明,受体活化后,与配基解离的热焓 (ΔH) 增加 $1.3kCal/mol^{[11]}$ 。这表明受体活化后,亚基与激素结合中心的构象,也有改变,从而与配基的结合更紧密。

在体内受体的活化,显然受多种生物因子的调控,如胞浆部分受体的转位作用与激素浓度有关,但是动物注射过量的激素,也不能使受体全部转位至细胞核内,似乎胞浆与细胞核内两部分受体,存在一种平衡关系。维持此种关系的机制,目前尚不清楚。也可能是细胞内存在某种抑制受体与细胞核结合的因子,而 PLP 可能起此种生理作用。Bailly 等曾报道^[16],在离体条件下, pH 值的改变,能改变系统中活化与未活化受体之间的平衡。但在体内,胞浆与细胞核内受体两者之间,是否也存在动态平衡的关系,尚缺乏直接的证据。

离体条件下,未占位受体亦能在肝素等因

子作用下发生“活化”,此种未占位的“活化”受体,是否就是存在于核内未占位受体的来源,以及核内这种未占位受体的生理作用,都是需要进一步深入研究的问题。

参 考 文 献

- [1] Jensen, E. V. and Desombre, E. R.: *Science*, **182**, 126—134, 1973.
- [2] Bailly, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 2729—2734, 1980.
- [3] Yang, C. R. et al.: *Biochem. J.*, **208**, 399—406, 1982.
- [4] Wolfson, A. et al.: *International Cell Biology* 1980—1981 (ed: H. G. Schweiger), pp. 860—871, Springer-Verlag, Berlin,
- [5] Wolfson, A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 1577—1585, 1980.
- [6] Nishigori, H. and Toft, D. O.: *Biochemistry*, **19**, 77—83, 1980.
- [7] Cake, M. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 4886—4891, 1978.
- [8] Müller, R. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 4062—4068, 1980.
- [9] Hiipakka, R. A. and Lai, S.: *J. Steroid Biochem.*, **13**, 841—846, 1980.
- [10] Nishigori, J. A. and Toft, D. O.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 9155—9161, 1979.
- [11] 杨常仁,袁玉萍(待发表)。
- [12] Cidlowski, J. A. and Thanassi, J. W.: *Biochemistry*, **18**, 2378—2384, 1979.
- [13] Yang, C. R. et al.: *64th Annual Meeting of Endocrine Society (San Francisco, 1982) Abstr.* No. 251.
- [14] Atger, M. and Milgrom, E.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 4758—4762, 1976.
- [15] Yang, C. R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **755**, 428—433, 1983.
- [16] Bailly, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **88**, 623—632, 1978.

[本文于1983年11月1日收到]