

クラス *c* に属する一酸化窒素還元酵素の複核活性中心に着目したキメラ分子の作成

### Chimeric protein for characterizing the dinuclear active center of a class-*c* nitric oxide reductase

櫻井宣彦<sup>a</sup>・太田彌助<sup>a</sup>・片岡邦重<sup>c</sup>・Bambang Triwiyono<sup>b</sup>・櫻井武<sup>c</sup>

<sup>a</sup> 名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科生命情報系

<sup>b</sup> Starch Technology Center, Agency for the Assessment and Application of Technology

<sup>c</sup> 金沢大学理工研究域物質化学系

Nobuhiko Sakurai<sup>a</sup>, Yasuke Ohta<sup>a</sup>, Kunishige Kataoka<sup>c</sup>, Bambang Triwiyono<sup>b</sup>, Takeshi Sakurai<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Division of Biological Science, Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, Yamanohata 1, Mizuho, Nagoya 467-8501, Japan

<sup>b</sup> Starch Technology Center, Agency for the Assessment and Application of Technology, Jalan Z.A. Pagar Alam No. 8/36 Bandar Lampung 35145, Indonesia

<sup>c</sup> Division of Material Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1192, Japan

Denitrification by denitrifying bacteria proceeds according to four sequential steps from  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{N}_2$  ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ), of which the reduction of NO to  $\text{N}_2\text{O}$  is catalyzed by nitric oxide reductase (NOR). cNOR is one of four class enzymes of NORs and is composed of two subunits, NorC and NorB. NorB has amino acid sequence homologous to that of the subunit I in cytochrome *c* oxidase (COX) which serves as terminal oxidase in the oxygen respiratory chain. This homology between cNOR and COX strongly suggests that they have evolved from a common ancestral gene. Although both NOR and COX are present in the same cell as paralogs, the former utilizes a non-heme center,  $\text{Fe}_B$  and the latter a copper center,  $\text{Cu}_B$ , in the construction of the active centers to reduce NO and  $\text{O}_2$ , respectively.

This study investigates the correlation between the non-heme and copper centers which are coupled with the high spin heme *b* center. Notably, *Roseobacter denitrificans* encodes a NorB-like protein that carries a copper, despite its extremely high homology with that of *Halomonas halodenitrificans* cNOR. Among twelve transmembrane (TM) helices in *H. halodenitrificans* NorB, TM VI to TM VIII are located in the proximal of the  $\text{Fe}_B$  region. We prepared synthetic DNAs to replace this region of the *Halomonas* NorB protein by the corresponding region of the *Roseobacter* homolog, and the resulting construct was used at the aims of expressing the chimeric cNOR in *Escherichia coli*. Expressed proteins were partially purified from the membrane fraction of the transformed *E. coli* cells using DEAE-Toyopearl 650 and ceramic hydroxyapatite column chromatographies by tracking the Soret absorption band as marker. Expression of NorC subunit was confirmed by immunoblotting using anti-NorC\* antibody. The  $\alpha$ -band at 550 nm for the reduced heme *c* has been found in the chimeric cNOR. In the electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum, a  $g = 4.2$  signal derived from non-heme center has been detected, although free  $\text{Fe}^{3+}$  as impurity also was detected impurity. In addition, the high spin heme was also detected at  $g \sim 6$ . However, no EPR signal derived from low hemes has been detected, while sensitivity for the low spin heme *c* is very low. These results suggest that the chimeric NorB was not properly incorporated into membrane, or the transmembrane helices did not properly form the pore to accommodate the metal centers.

## 1. はじめに

脱窒とは、水溶性の  $\text{NO}_3^-$  や  $\text{NO}_2^-$  などの硝酸態窒素が、ガス分子状の窒素化合物として、大気中へ放散される現象であり、 $\text{NO}_3^-$  から  $\text{N}_2$  への完全脱窒は細菌に限られた能力である[1]。無機窒素塩類を化学肥料として多用する近代農業では、作物に必要なとされる以上の施肥により残留無機窒素塩類が地下水へ侵入し、汚染することが問題となっている。脱窒菌はその除去に重要な役割を果たしているといえるが、地中に存在する脱窒菌による消費分がそもそも、窒素肥料の過剰施肥を導いているとも言える。脱窒過程とは括弧内の4段階の反応からなっており( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ )、 $\text{NO}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  への還元は Nitric Oxide Reductase (NOR)により触媒される[2, 3]。NOR には構造的に4つのクラスが有り、そのうち cNOR は2つのサブユニット, NorC および NorB から構成されている。NorB サブユニットは、酸素呼吸鎖末端酸化酵素であるシトクロム c オキシダーゼ (COX)の酸素還元部位を含むサブユニット I と一次構造上の相同性を有し、両者は共通祖先を持つと考えられている[4-6]。NOR と COX はパラログとして同一細胞内に存在するにもかかわらず、cNOR の非ヘム金属として鉄イオンが、そして COX では銅イオンが選択される(図1)。一方、深海から単離された *Roseobacter denitrificans* には cNOR に非常に高い相同性を示すが NOR 活性を持たず弱い COX 活性を有する NOR ホモログが存在するが、その非ヘム金属は銅であると推定されている[7-9]。本研究では両酵素の非ヘム金属の種類と基質との相関研究の一環として、*Halomonas* NorB サブユニットの活性中心を形成する pore B の膜貫通型ヘリックス領域の一部を、非ヘム金属として銅を有すると推定される *Roseobacter* NOR ホモログの相当部分に置き換えたキメラ型 cNOR の作成を試みた。その結果、活性中心を有する pore B を形成する膜貫通型ヘリックス領域が NorB サブユニットの生体膜への組み込みや cNOR の高次構造の維持に重要な働きを演じている可能性が示唆された。

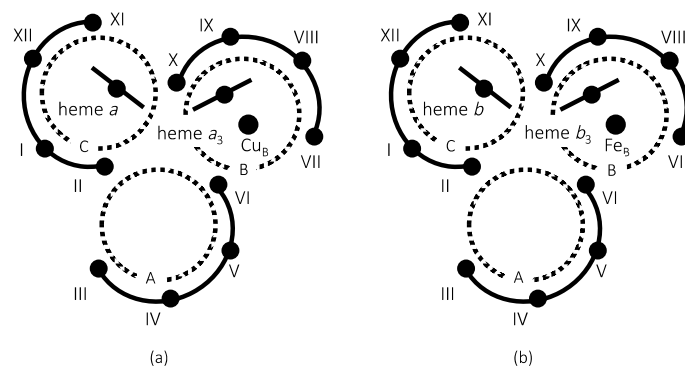


図1. COXI と NorB サブユニットの膜貫通ヘリックスと酸化還元金属中心の配置

(a) *Paracoccus denitrificans* の COX I を膜に垂直方向からみた膜貫通型ヘリックス

(b) 脱窒菌 NorB サブユニットの膜貫通型ヘリックス

黒丸は  $\alpha$  ヘリックスを示し、破線で囲まれる領域は、半円を描く4つのヘリックスと、隣接する半円の端に位置するヘリックスの計5つのヘリックスにより膜を貫通する pore A および B, C を形成する。

## 2. 実験方法

### 2.1 PCR法を用いたキメラ組換え DNA フラグメントの作成

150 bp から 200 bp 程度の polymerase chain reaction (PCR) 産物が得られるように、プライマー混合溶液の a から c の 3 種 (a: U01~U04 と L11~L14, b: U04~U09 と L06~L11, c: U09~U14 と L02~L06, Lower Primer (NsiI site) ; 5'-AAAATGCATAAAACCCCAAA-3') を別々に調製して、1st. PCR を行った (図2)。その際、Invitrogen 社の PCRx エンハンサーシステムと Roche 社の FastStart Taq DNA ポリメラーゼを用いた。1st. PCR 後の反応溶液 a および b, c の混合物をテンプレートとし、さらに、2nd. PCR を行った。2nd. PCR 後の反応溶液をテンプレートとし、SpeI 切断部位がコードされたプライマー (Upper Primer (SpeI site) ; 5'-GGACTAGTATGACCCTGCTGA-3') と Lower Primer (NsiI site) を用いて、3rd. PCR を行った [11]。得られた PCR 産物を、QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN 社) により T-A Cloning した。

### 2.2 キメラ型 NorB DNA フラグメントの PCR 法による修復

キメラ組換え DNA フラグメントにおいて、U02 から U03 へのつながりはプラス鎖ではチミン塩基が、マイナス鎖ではアデニン塩基が 6 個並ぶ配列をとるが、DNA シークエンサーにて配列確認したところ、1 塩基欠損していた。そこで、キメラ型 NorB DNA フラグメントが挿入されたプラスミドを鋳型とし、Upper Primer (SpeI site) とプライマー (5'-CCAGAACACTGCTGCCAG-3') の組合せ、ならびにプライマー (5'-GCAGTGTCTGGCTGTTTGC GTT-3') と L08 プライマーの組合せを用いた PCR を行い変異を導入した。さらに反応溶液を鋳型として Upper Primer (SpeI site) と L08 プライマーを用いて PCR により、2 つの PCR 産物を連結させた。次いで、再度 T-A Cloning を行い Spe I-Nur I サイト間を切り出し、実験方法 2.1 でクローニングされたプラスミドベクターの相当部位と入れ替えた。DNA シークエンサーにより塩基配列を確認後、Spe I-Nsi I サイト間を切り出し、pTVNORdSL の相当部位へ挿入し、キメラ発現プラスミド pTVNORexTM678dSL を構築した [16]。

### 2.3 DNA シークエンス

プラスミド精製後、DNA シークエンスにより配列確認を行った。DNA シークエンサーには、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いた。

### 2.4 NOR 活性測定法

反応溶液減圧後、4.59% NO ガスを封入し、熱伝導度検出型ガスクロマトグラフ (GC-8A, 島津製作所) を用いて、NO の還元能を測定した。還元反応は、30°C で行った [11, 12]。カラムは、Molecular Sieves 5A (2m×3mm i.d., Yanaco 社) を使用した。キャリアーガスの圧力は、160 kPa であった [12-15]。

### 2.5 キメラ型 cNOR の大腸菌での発現と単離精製方法

我々が開発した cNOR の異種発現系に準じて培養から精製まで行った [16]。

### 2.6 膜タンパク質の定量と抗 NorC\* 抗体によるウェスタンブロット法

タンパク定量は界面活性剤の影響を受けない Bicinchoninic Acid (BCA) 法を使用した [17]。ウェスタ

ンブロットの1次抗体には、抗 NorC\*抗体を用いた[16]。

## 2.7 UV-Vis と ESR スペクトルの測定

吸収スペクトルは、JASCO J-500C 分光光度計で測定した。EPR スペクトルの測定は Oxford 液体ヘリウムクライオスタットが取り付けられた Bruker ESP-300E X バンド分光器を用いて測定した。

SerMetThrLeuLeuLysGlyArgLysThrAlaIleAsnMetValLeuMetLeuGlyLeuTrpLeuAlaAlaValPheTrpLeuPhe	166
U01 U02 * *	
<u>CTAGTATGACCTGCTGAAAGGTCGTAACCGCAATTAACA</u> <u>TGGTTCTGATGCTGGTCTGTGGCTGGCAGCAGTGT</u> <u>CTGGCTGTTT</u>	89
<u>ATACTGGGACGACTTTCCAGCATT</u> <u>TTGGCGTTAATTGTACCAAGACTACGACCCAG</u> <u>ACACCGACCGTCGCACAAGACCGACAAA</u>	430
L15 L14 L13 * *	VI
AlaPheTyrAsnProSerAsnLeuAlaLeuAspLysMetTyrTrpTrp	196
<u>TyrValValHisLeuTrpValGluGlyThrTrpGluLeuVal</u>	
U03 U04 U05	
<u>GCGTTTTACAACCGTCTAACCTGGCGCTGGATAAAATGTACTGGTGGTACGTGGTGCAC</u> <u>CTGTGGTGGAAGGCACCTGGGAAGCTGGTG</u>	179
<u>CGCAAAATGTTGGGAGATTGGACCGCAGCTATTTTACATG</u> <u>CCACCATGCACCACGTGGACACCCACCTTCCGTG</u> <u>GACCCCTTGACCAC</u>	340
L12 L11	
<u>MetAlaSerValLeuAlaPheLeuMet</u> <u>LeuLysLeuThrGlyValAspArgGluIleIleGluLysTrp</u> <u>LeuTyrLeuIleValAlaThr</u>	226
U06 Nur I U07	
<u>ATGGCGTCTGTTCTGGCGTTTCTGATGCTGAAACTGACCGCGTGGATCGCGAAATCATCGAAAAATGGCTGTACCT</u> <u>GATCGTGGCGACC</u>	269
<u>TACCGCAGACAAGACCGCAAA</u> <u>ACTACGACTTTGACTGGCCGACCTAGCGCTT</u> <u>AGT</u> <u>AGCTTTTACCGACATGGACTAGCACCCTGG</u>	250
L10 VII L09 L08	
<u>AlaLeuPheSerGlyIleLeuGlyThrGlyHisHisTyr</u> <u>PheTrpIleGlyThrProGlyTyrTrpGlnTrpIle</u> <u>GlySerIlePheSer</u>	256
U08 U09 U10	
<u>GCAGTGTTTCTGGCATTCTGGG</u> <u>CACCGGTCACTACTTTGGATCGGCACCCDGGTTATTTGGCAGTGGATCGGCTCTATCTTTTCT</u>	359
<u>CGTGACAAAAGACCGTAAGACCCGTGGCCAGTGGTGAT</u> <u>AAAACCTAGCCGTGGGGCCAATAACCGTCACCTAGCCGAGATAGAAAAGA</u>	160
VIII L07 L06 L05	
<u>AlaLeuGluValValProPhePheGlyMetMetAlaPhe</u> <u>AlaPheValMetValTrpLysGlyArgLysAspHisProAsnLysAlaAla</u>	286
U11 U12	
<u>GCGCTGGAAGTGGTGGCGTTTTGGCATGATGGCGTTT</u> <u>GGCTTTGTGATGGTGTGGAAAGCCGTAAGATCACCGAACAAGACGCA</u>	449
<u>CGCGACCTTCAACACGGCA</u> <u>AAAAACCGTACTACCGCAAACGCAAAACACTACCACACCTTTCCGGCATTCTAGTGGCTTGTTCGTCGT</u>	70
L04 L03	
MetLeuTrpAlaLeuGlyCysProThrMetAlaPhePheGlyAlaGlyValTrpGlyPheMet	307
U13 U14 Nsi I	
<u>ATGCTGTGGGCACTGGGTGT</u> <u>CGACTATGGCATT</u> <u>TTTTGGTGCAGGTGTTGGGGTTTTATGCA</u>	514
<u>TACGACACCGTGACCCAACAGGCTGATACCGTAAAAAACCA</u> <u>CGTCCACA</u> <u>AAACCCAAAATACGTA</u>	1
1 L02 Lower Primer (Nsi I site)	

図2. 置換部分のアミノ酸配列と塩基配列

塩基配列上のボックスは合成 DNA, U01~U14 はプラス鎖, Lower Primer (Nsi I site)と L02~L15 はマイナス鎖。アミノ酸配列上のボックスは膜貫通領域を表し、ローマ数字はそのヘリックス番号を表す。アミノ酸配列の右側の数字はキメラ分子におけるアミノ酸番号を示す。塩基配列の右側の配列は 5'末端からの塩基の長さを示す。塩基配列上の\*は最終的に PCR 法により、サイレント変異が加えられた。実際にはプラス鎖では 77 番目と 80 番目の T がそれぞれ G, C へ、マイナス鎖では 239 番目と 242 番目の A がそれぞれ G, C へ改変された。アンダーラインが付されたアミノ酸は *Halomonas* cNOR から変異により換えられたアミノ酸であり、Leu176 から Asp280 までが *Roseobacter* NOR ホモログの対応する部分と置換された。アンダーラインが付された塩基配列は制限酵素認識部位である。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 キメラ型 NorB 発現プラスミドの構築

本研究では両酵素の非ヘム金属の種類と基質との相関研究の一環として、*Halomonas* NorB サブユニットの活性中心を形成する pore B の膜貫通型ヘリックス領域の一部を、非ヘム金属として銅を有すると推定される *Roseobacter* NOR ホモログの相当部分に置き換えたキメラ分子の作成を試みた。実際には、NorB の有する12の膜貫通型ヘリックス(transmembrane ; TM)のうち、非ヘム鉄 Fe<sub>B</sub> の近傍に存在する TM VI から TM VIII を *Roseobacter* NOR ホモログの相当部分と置換した。Taq DNA リガーゼを用いて高温下でのサイクル反応により合成 DNA を連結させようとしたが、成功に至らなかった。そこで、連結にはPCR法を採用した。複雑な反応とならないように、150 bp から 200 bp 程度の長さで3つに分けてPCRを行った(図3)。また、1st および 2nd PCR は様々なプライマーを用いているため、反応条件の検討を必要とすることから、プライマーの特異性を高め、広範囲のマグネシウム濃度と、広範囲のアニーリング温度を与える Invitrogen 社の PCRx エンハンサーシステムを用いることで対処した。結果、設計通りのサイズのフラグメントが得られた。しかしながら、プライマーU02 から U03 のつなぎ目に並ぶ6個のチミン塩基が1塩基欠損していた。エラーやミス防止のために隙間なく設計したプライマーであったが、同じ塩基が連続しており、加えてプライマー同士のつなぎ目であったため、伸長時に塩基の欠損が生じたと推定される。そこで、欠損した塩基の補充とサイレント変異となるようなコドンへの変更を目的に、新たに DNA プライマーを合成し、PCRを行った結果、当初設計した U02 と U03 のつなぎ目の 5'-TTT TTT-3'の配列は、5'-TGTTCT-3'と書き換えられ、欠損箇所の補充とアミノ酸の置換を生じないサイレント変異を導入することができた。

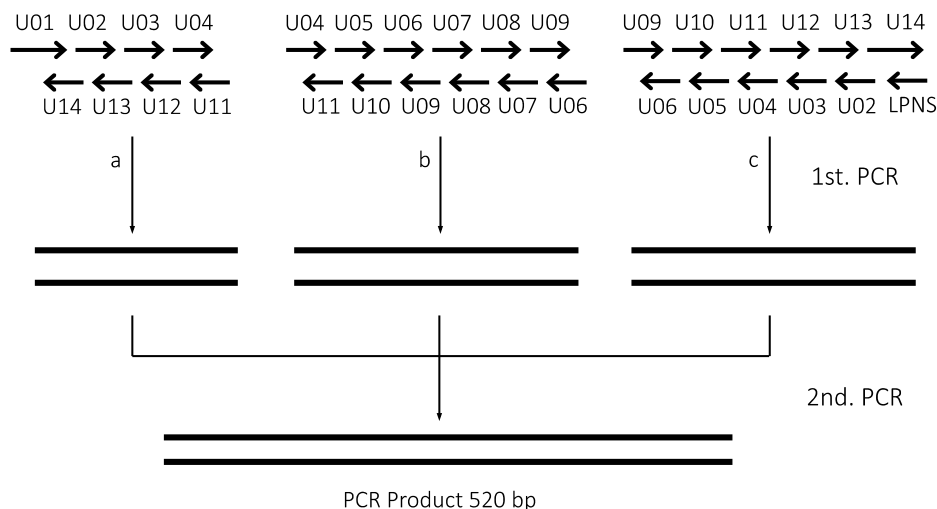


図3. PCR法を用いたキメラ型 NorB 遺伝子の合成

a および b, c はそれぞれ反応溶液 a および b, c を表す。

LPNS : Lower Primer (NsiI site)の略

### 3.2 キメラ型 cNOR の精製とその性質

キメラ型 cNOR の精製は既に確立している cNOR の精製法に準じ TOYOPEARL DEAE-650 カラムクロマトグラフィー後に ceramic hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーを行った。野生型 *Halomonas* cNOR (Wild type) も同時に精製を行い比較対象としたところ、TOYOPEARL DEAE-650 カラム上の溶質位置にはほぼその差が無かったものの、続いて行った ceramic hydroxyapatite カラム上の溶出パターンに顕著な違いが見られた。*Halomonas* cNOR は通常、強固に hydroxyapatite と結合し、0.7 M 以上の高濃度のリン酸バッファー溶液により溶出するが、ヘムのソーレー帯を指標にして回収されるキメラ型 cNOR は 0.5 M リン酸バッファー溶液で溶出した(データ非表示)。また、TOYOPEARL DEAE-650 溶出物の sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 後の Anti-NorC\* 抗体によるウェスタンブロットニングを行ったところ、NorC のバンドが検出された(図 4)。また、ceramic hydroxyapatite カラム溶出タンパク質の SDS-PAGE は NorC のバンドが極めて弱く、キメラ型 NorB に相当するバンドはみられなかった(データ非表示)。これは発現しているキメラ型 NorB が異常なコンフォーメーションを取っており、高濃度の塩の影響で変性作用を受けたか、あるいは NorC 単独で存在している可能性が考えられる。

### 3.3 キメラ型 cNOR の分光学的性質

ceramic hydroxyapatite カラム溶出タンパク質をジチオナイトにより還元した後、紫外-可視スペクトルを測定すると、heme *c* の  $\alpha$  バンドに由来すると思われる 550 nm の吸収がみられた(データ非表示)。EPR スペクトルでは  $g = 4.2$  のシグナルが得られたが、比較的幅広いシグナルとシャープなシグナルが重なっていることから、磁氣的に独立した  $\text{Fe}_B$  と不純物の  $\text{Fe}^{3+}$  (マイナー) が検出されたものと思われる。

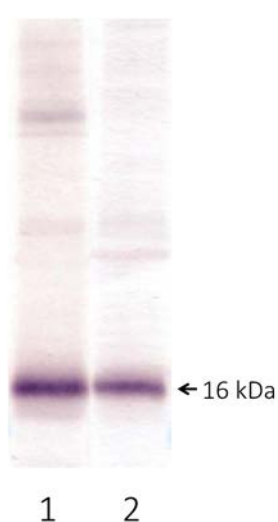


図 4. TOYOPEARL DEAE-650 溶出タンパク質の NorC\* 抗体によるウェスタンブロット

Lane1; *Halomonas* cNOR

Lane2; キメラ発現系溶出タンパク質

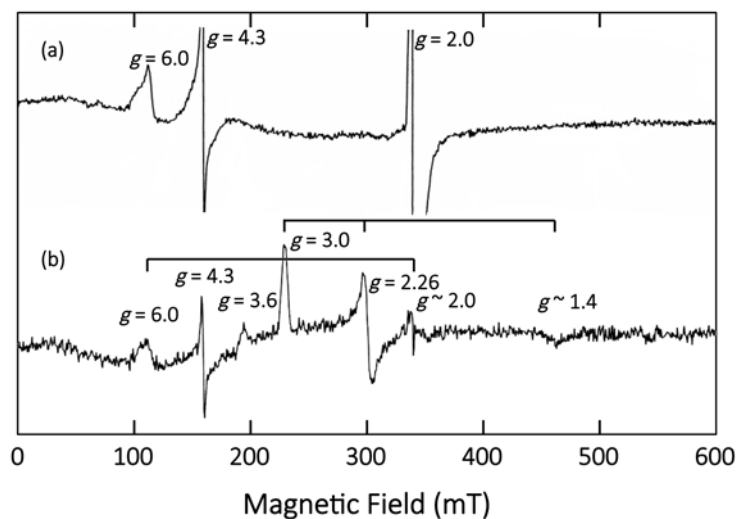


図 5. EPR スペクトルによる *Halomonas* cNOR と ceramic hydroxyapatite カラム溶出タンパク質の比較

(a) ceramic hydroxyapatite 溶出タンパク質

(b) *Halomonas* cNOR

Frequency 9.5 GHz, temperature 4.5 K (a), 4.0 K (b)

また、高スピン heme  $b_3$  に由来する  $g \sim 6$  のシグナルも得られている。しかしながら、低スピン heme  $b$  に由来する  $g = 3.0$ ,  $g = 2.26$ ,  $g \sim 1.4$  のシグナルや heme  $c$  に由来する  $g \sim 3.6$  のシグナルは認められなかった(図5)。ただし、対称性の低い heme  $c$  に由来するシグナルの検出感度が低いことから、吸収スペクトルにおいて、heme  $c$  の存在は確認できたが、その C 型ヘムの生成量はあまり高くない可能性がある。

#### 4. 要約

PCR 法を用いて合成 DNA を伸長させ連結したところ、*Halomonas* cNOR と *Roseobacter* NOR ホモログのキメラタンパク質発現ベクターを構築することに成功した。しかしながら、キメラ型 cNOR の精製には至らなかった。キメラ体では NorBC 両サブユニットが合成されているにもかかわらず、TM VI から TM VIII 領域の置換により正常な細胞膜への組み込みが行われていないか、あるいは非常に不安定なタンパク質となり、高い塩濃度での変性作用を受けやすくなっているのかも知れない。このことは活性中心の pore B を形成する膜貫通型ヘリックス領域が生合成後の生体膜への組み込み、あるいは cNOR の高次構造の安定化のために重要な働きを演じている可能性を示唆している。

#### Acknowledgment

この研究は、日本学術振興会グラント番号 JP26288076 (T.S.) および JP19570125 (K.K.) のサポートを受けた。

#### 文献

- 1) Zumft, W.G., Korner, H., *Antonie Van Leeuwenhoek*, **71**, 43–58 (1997).
- 2) Averill, B.A., *Chem. Rev.*, **96**, 2951–2964 (1996).
- 3) Oubrie, J.A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., Saraste, M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 266–273 (2000).
- 4) Shiro, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1907–1913 (2012).
- 5) Hendriks, J., Gohlke, U., Saraste, M., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 15–24 (1998).
- 6) Saraste, M., Castresana, J., *FEBS Lett.* **341**, 1–4 (1994).
- 7) Kimura, M., Ishii, M., Igarashi, Y., Arai, H., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **76(10)**, 1984–1986 (2012).
- 8) Matsuda, Y., Uchida, T., Hori, H., Kitagawa, T., Arata, H., *Biochimica et Biophysica Acta, Bioenergetic*, **1656(1)**, 37–45 (2004).

- 9) Matsuda, Y., Inamori, K., Osaki, T., Eguchi, A., Watanabe, A., Kawabata, S., Iba, K., Arata, H., *Journal of Biochemistry*, **131**(6), 791-800 (2002).
- 10) Kataoka, K., Nakai, M., Yamaguchi, K., Suzuki, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **250**(2), 409-413 (1998).
- 11) Heiss, B., Frunzke, K., Zumft, W.G., *J. Bacteriol.*, 171(6), 3288-3297 (1989).
- 12) Sakurai, N., Sakurai, T., *Biochemistry*, **36**, 13809-13815 (1997).
- 13) Sakurai, T., Sakurai, N., Matsumoto, H., Hirota, S., Yamauchi, O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 248-251 (1998).
- 14) Kurose, S., Sakurai, N., Sakurai, T., *J. Inorg. Biochem.*, **83**, 281-286 (2001).
- 15) Sakurai, T., Nakashima S., Kataoka, K., Seo, D., Sakurai, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 483-487 (2005).
- 16) Sakurai, N., Kataoka, K., Sugaya, N., Shimodaira, T., Iwamoto, M., Shoda, M., Horiuchi, H., Kiyono, M., Ohta, Y., Triwiyono B., Seo, D., Sakurai T., *Journal of Inorganic Biochemistry*, **169**, 61-67 (2017).
- 17) 志村清仁, 笠井献一, 新牛化学実験講座 1 タンパク質 I-分離・精製・性質-, 87-107 (1990).