

一方, カプトプリルの添加濃度の変化による Dixon Plot も同様に直線を示し, この時の P-I および II の K_i 値は 2.8 nM および 6.7 nM であった (Fig. 12).

9. 免疫化学的分析

ヒト腎臓 ACE に対する抗体を用い, ヒト小腸より得られた ACE (P-I および II) について, 二重免疫拡散法による検討を行った (Fig. 13). P-I (Fig. 13, ウェル 2) および II (Fig. 13, ウェル 3) のいずれも明瞭な一本の沈降線が得られ, かつそれらはヒト腎臓 ACE (Fig. 13, ウェル 1 と 4) の沈降線と完全に融合した.

また, 同抗体の希釈溶液 (10,000 倍まで) による活性阻害試験では, P-I および II のいずれも添加抗体量が増加するにつれて, 残存活性の減少が見られ, 双方の阻害曲線はほぼ一致した (Fig. 14).

次に、ウェスタンブロッティングを行い、本抗体を用いてACEの検出を行ったところ、分子量約180 kDaの位置にP-Iのバンド (Fig. 15, レーン2) が、そして分子量約100 kDaの位置にP-IIのバンドが認められた (Fig. 15, レーン3)。

腎臓ACEは分子量約170 kDaの位置にバンドが認められた (Fig. 15, レーン1)。

10. ヒト各組織抽出物の Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー

大脳、肺、腎臓、および精巣の膜画分をトリプシン消化後遠心して得た上清、小腸、前立腺の遠心上清並びにヒト血清、精漿についてSephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィーを行い、これら組織のACEの分子量を比較した。大脳、肺、腎臓、前立腺、および血清では、ACEは1種しか認められなかった。しかしながら、精巣、精漿および小腸では分子量の異なる2種のACEが認められた (Fig. 16)。

IV. 考察

ACEは血管内皮細胞¹⁹⁾の他に、多くの組織の細胞に見い出されている。腎臓²⁰⁾、小腸²⁰⁾や胎盤の上皮細胞、特にその刷子縁²¹⁾には、他の組織の内皮細胞よりもはるかに多くのACEが存在し、更に、神経上皮細胞を含むこれら組織のヒトACEは、類似したタンパク構造を有していると考えられている²²⁾。今回行ったヒト組織中および体液中におけるACEの分布の検討においても、広範囲にACE活性が認められ、ヒトの死後の各組織等について検討したLieberman & Sastreの報告⁴⁾とほぼ一致した結果を得た。

ヒト小腸1g中のACE活性は腎臓、肺、精巣等より低値を示すものの、臓器重量を考慮に入れた臓器全体の総活性値では腎臓、肺について高値を示すことから、ヒト小腸には多量のACEの存在が推定される。ラット小腸の部位別のACE活性の差について、Yoshiokaら²³⁾は上部より徐々に活性が上昇し、中央部で最大

となり、その後、次第に低下を示し、末端部では上部よりも低値を示すと報告しているが、私の成績も、ラットと同様の傾向を示した。

各組織におけるACEは膜結合性タンパクと考えられ、ヒト小腸についても、Wardら²⁴⁾が粘膜組織の120,000xg遠心沈澱物にACE活性を見いだし、Brunevalら²⁰⁾は免疫電顕法を用いて、ヒト小腸刷子縁にACEの存在を報告している。今回剖検時に採取し凍結保存後用いたヒト小腸では、その活性の90%以上が遠心上清に見い出されたが、手術時採取新鮮標本では上清画分にACE活性がほとんど見い出されないこと、そして剖検時採取試料の105,000xg沈澱物をトリプシン処理した場合、トリトン X-100に比べ分子量の小さいACEの割合が増加することから (Fig. 3, EとC)、今回得られた結果は、膜結合性ACEが、小腸粘膜に多量に存在するタンパク分解酵素により autolysisを受け、超遠心上清に抽出された可能性が考えられた。ところで、ヒト小腸よりトリトン X-100抽出

を行った場合, Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー上で, より大きな分子量を示すACEが出現したが (Fig. 3, AとC), トリプシン抽出ではこの分子量のACEは消失した (Fig. 3, BとE). これはトリトン X-100により可溶化されたACEは, 疎水性が高く, 従って, Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー上でアグリゲーションを形成し, 巨大分子のような挙動を示したものと思われた. 一般に膜結合性ACEの可溶化は, トリトン X-100などの界面活性剤によるか, またはトリプシン処理によって行われている. トリトン X-100により可溶化されたACEは, 分子量約4,000-5,000の疎水性のいわゆる "anchor" 部分を含んでおり, この部分がゲルとの相互作用を生じ, ゲルクロマトグラフィー上不可解な挙動を示す²⁵⁾ことになるとされている. 一方, トリプシン処理ではこの "anchor" 部分が除かれ, より親水性となった形で可溶化されてくるものの, トリトン X-100処理により得られ

た ACE とは比活性, SDS-PAGE 法による分子量に差が見られないとされている²¹⁾。こうした理由から, 本研究では新鮮なヒト小腸を大量に入手することが困難なことも併せて, 剖検時採取試料の遠心上清から ACE の精製を行った。

ヒト小腸ホモジネート遠心上清より硫酸分画法および DEAE-cellulose クロマトグラフィー法にて得られた粗抽出液を ACE の特異的阻害剤 lisinopril をリガンドとした Sepharose 6B カラムに付し, 4.0 M 尿素 (1.0 M NaCl 含有) 溶液にて ACE を溶出した。従来, lisinopril-linked Sepharose 6B からの ACE の溶出には, ACE の特異的阻害剤である, カプトプリル (92 μ M) が使用されてきたが¹⁴⁾, この方法では溶出されてきた ACE の活性を測定する際に, カプトプリルのマスキング剤である N-ethylmaleimide (1.0 mM) の添加を必要とすると同時に, ACE 分画の十分な透析操作も必要とされていた。しかし, 今回, 4.0 M 尿素により酵素活性を失わず溶出され, 十分な回収率を得る

ことができたため、以後この方法にてACEの溶出を行った。Lisinopril-linked Sepharose 6Bカラムクロマトグラフィー法により得られたACE分画は、Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー上で2種のピーク（P-IおよびII）に分離された。このときの精製度は、Lisinopril-linked Sepharose 6Bクロマトグラフィーの段階で、約1,500倍以上、回収率は、約27%であった（Table 2）。なお、硫酸分画による精製段階において、回収率が100%と高値を示したが（Table 2）、これは前段階、35,000xg上清中にACE活性を阻害する物質が存在し、硫酸分画および透析操作によりそれらの物質が除かれたため、高回収率を示したものと推定された。ACEは活性中心に Zn^{2+} を有していることから、システイン等のSH化合物によってACE活性は阻害されることが知られている²⁶⁾。また、ACEの内因性阻害物質について、Cushman & Cheung²⁷⁾はラット組織ホモジネート中に、Lieberman & Sastre⁴⁾

は、ヒト組織ホモジネートを希釈する事により組織中ACEの比活性が上昇する事から、内因性阻害物質の存在を示唆している。更に、Hazato & Kaseは、ブタ血漿²⁸⁾より、羽里らはウシ髄液中²⁹⁾より、河村³⁰⁾はオキアミ、イワシそして大豆の各タンパク質をトリプシン処理することにより、ACEを強力に阻害するペプチドを得たと報告している。著者もヒト脾臓中にACE活性を阻害する透析性物質の存在を見いだしている(データ未公表)。

得られた2種のACEのそれぞれの分子量は、SDS-PAGE法およびウェスタンブロッティング法にて180 kDa (P-I) および100 kDa (P-II) であり、P-Iの分子量は、同様にして精製したヒト腎臓ACE(分子量約170 kDa)より僅かに大きな値を示した。肺ACEの分子量については130 kDa³¹⁾、155 kDa²⁵⁾、160 kDa³²⁾ および180 kDa³³⁾と報告されているが、Lanzilloら³⁴⁾はトリプシンおよびトリトンX-100により可溶化後精製した肺ACEはいずれ

も分子量 140 kDa であると報告している。腎臓 ACE の分子量は、140 kDa³⁴⁾、150 kDa²⁵⁾、160 kDa³²⁾ および 170 kDa³⁵⁾ と報告されている。さらには、今回得られた腎臓 ACE および小腸 ACE もほぼ同様の分子サイズを示していることから、小腸 ACE (P-I) は肺および腎臓 ACE とほぼ同じ分子サイズを示すものと思われる。

基質 HHL に対する ACE の比活性は、肺：100-110 mU/mg^{31, 32)}、腎臓：80-110 mU/mg^{32, 36)} と報告されているが、今回得られた P-I は 156 mU/mg とこれらに比べてやや高い値を示した。この差は酵素活性測定に用いた緩衝液の組成によると考えられる。今回用いた ACE 活性測定法¹²⁾ は、従来繁用されている Lieberman の方法³⁷⁾ より約 2 倍高い活性値を示す¹²⁾ ことから、今回得られた P-I の比活性値は従来報告されている肺および腎臓の比活性値と同様の範囲に属するものと考えられた。

基質 HHL の分解は P-I および II いずれも pH 8.0-8.5 において、また活性発現に必須と

される Cl^- 濃度は, P - I が 0.8 M, P - II が 0.6 M で最も高い効率を示し, 報告されている腎臓³⁵⁾, 前立腺³⁸⁾より精製された ACE での至適 Cl^- 濃度 (0.8 M) と一致した。

HHL に対する K_m 値は, P - I : 1.75 mM, II : 1.68 mM であり, この値は肺より精製された ACE : 1.3 mM²⁵⁾, 1.6 mM³¹⁾, そして 1.9 mM³²⁾ および腎臓より精製された ACE : 1.3 mM²⁵⁾, 1.7 mM³²⁾ および 2.0 mM³⁵⁾ および精巢 ACE (140 kDa) : 1.7 mM³⁴⁾ と類似の値である。また, P - II も, 上記の各 ACE 並びに精巢 ACE (90 kDa) : 1.8 mM³⁴⁾ と類似の値を示した。さらに, P - I の人工基質 HGG に対する K_m 値は, 7.5 mM であり, この値は肺 ACE : 6.2 mM²⁵⁾ および腎臓 ACE : 6.4 mM²⁵⁾ と類似の値と考えられた。さらに内在性基質アンギオテンシン I に対する K_m 値は 39.5 μM であった。肺 ACE については, 30 μM ²⁵⁾ および 62 μM ³²⁾, 腎臓 ACE で, 76 μM ³²⁾, そして血清 ACE では, 71 μM ³⁹⁾ と報告されているが, 今回得られた値は, 肺 ACE の

K_m 値, $30 \mu M^{31)}$ とほぼ一致した。なお, その他の内在性基質であるブラジキニン, $[Met^5]$ -および $[Leu^5]$ -エンケファリンは P-I により加水分解を受け, C末端よりそれぞれジペプチドが遊離し (Fig. 9), 肺, 腎臓, および精巣 ACEによるこれらのペプチドの分解を報告している Lanzilloら³⁴⁾や Erdosら²¹⁾の報告と一致した。

次に, P-I および II 活性は特異的阻害剤, カプトプリルにより強力に阻害され, P-I および II に対する IC_{50} は, それぞれ $13 nM$, $20 nM$ であり, K_i 値は, P-I で $2.8 nM$, P-II で $6.7 nM$ であり, 肺 ACE: $1.5 nM$ および 腎臓 ACE: $1.3 nM$ とする Ehlersら³²⁾の報告している K_i 値とほぼ同様の結果であった。

以上から, ヒト小腸の2種の ACE (P-I および II) は, 分子量が異なり, 活性発現に必要な Cl^- の至適濃度 (P-I : $0.8 M$, P-II : $0.6 M$) に若干の差が認められるが, 至適 pH (P-I および II : $8.3-8.5$) や基質 HHL に対す

る K_m 値も類似し (P-I : 1.75 mM, P-II : 1.68 mM), さらに, ACEの特異的阻害剤カプトプリルによる阻害も同じ様式を示すことなどから, P-I および II は非常によく似た酵素化学的性状を有すと考えられた。また, 抗ヒト腎臓 ACE抗体を用いた免疫化学的検討 (1: 二重免疫拡散法, 2: 活性阻害試験法, 3: ウェスタンブロットティング法) の結果等から, これら2種の ACEは腎臓 ACEと類似する抗原性を有していると同時に, P-I は肺および腎臓 ACEの両者に類似した酵素化学的性状を有していると考えられた。

1985年, Lanzilloら³⁴⁾は, ヒト精巣に分子量の異なる2種の ACE (140 kDa および 90 kDa) の存在を見出している。これらの ACEは酵素化学的性状並びに抗原性において非常に類似しているが, 分子量 90 kDa の ACEは, 140 kDa の ACEからの分解産物であるのか, 両酵素に異なる mRNA が存在し別々の経路で生合成されるのかは明かでない。著者がヒト小腸より

得た2種のACEは、小腸膜分画よりトリトン X-100にて抽出されたACEのピーク (Fig. 3, C; Peak-1) が、トリプシン処理により Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー上で2種のピークに分離すること (Fig. 3, E; Peak-2,3) や、精製された双方の酵素化学的性状および免疫化学的性状が極めて類似していることから、ヒト小腸より得られた100 kDaのACEは小腸内蛋白分解酵素の作用を受け、180 kDaのACEより産生された可能性も考えられるが、この点に関しては今後遺伝子レベルでの解析等が必要と思われた。しかしながら、ACE自体はトリプシンに対して抵抗性を示すことが報告されている⁴⁰⁾。事実、ヒト各組織をトリプシン処理した後ACEを抽出、Sephacryl S-300 HRカラムクロマトグラフィー法により分離を行ったところ、腎臓、肺、前立腺 (トリプシン未処理) 並びに大脳ではACEは1種のみ認められたが、小腸および精巣には2種のACEが認められた (Fig. 16)。さらに、

Lanzilloら³⁴⁾が1種のACEの存在を報告しているヒト精漿において、トリプシン未処理であるにもかかわらず、同クロマトグラフィー上において、2種のACEが観察された (Fig. 16)。この成績から、小腸および精巣ACEはトリプシンに対する感受性 (抵抗性) において、腎臓、肺、前立腺および大脳ACEと相違することが示唆された。

ところで、ACEは、カルボキシジペプチダーゼとしてアンギオテンシン I 及びブラジキニンの分解を行うことが知られていたが、近年、これら以外にもエンケファリン類^{9, 25)}、ニューロテンシン¹⁰⁾、サブスタンス P¹⁰⁾、黄体形成ホルモン放出ホルモン¹¹⁾、ネオキョートルフィン⁴¹⁾などの生理活性ペプチドを分解し、C末端よりジペプチドを遊離し、さらに、デスアルギニルブラジキニン (des-Arg⁹-bradykinin) やC末端をアミド化により保護したサブスタンス P や黄体形成ホルモン放出ホルモンのC末端より、トリペプチドを遊離するな

どの多彩な性状が報告⁴²⁾され、特に脳内におけるACEの役割が注目を浴びている。一方、小腸においても数多くの生理活性ペプチドが存在し、それらの多くは脳内の生理活性ペプチドと共通している。今回、内在性ペプチドに対する小腸ACE(P-I)の分解能について検討し、ヒト腎臓、肺、血清および精巣ACEと同様に、アンギオテンシンI、ブラジキニン、並びに[Met⁵]-および[Leu⁵]-エンケファリンを加水分解しC末端よりHis-Leu, Phe-Arg, Phe-MetおよびPhe-Leuのジペプチドをそれぞれ遊離した(Fig. 9)。ところで、Thieleら⁴³⁾は、C末端をアミド化したサブスタンスPにはACEの作用部位が複数存在し、ACEによりジペプチドやトリペプチドを産生することや、サブスタンスKはラット脳ACEにより分解を受けるが、ラット肺ACEにより分解されないこと等から、ラット脳ACEと肺ACEとはペプチドの分解能に差があることを報告している。今回検討を行ったペプチド類はすべてC末端がフリ

一の形で存在し、産生されたペプチドはすべてジペプチドであったが、今後その他のペプチド類についても同様の検討を行う必要があると思われる。

小腸ACEの生理機能については、現在十分な検討がなされていないものの、先に述べたACEの多彩な性状から、Erdoesら⁴²⁾は、小腸ACEは摂食時、小腸において分解されたタンパク質の各フラグメントをさらに小さなフラグメント（ジペプチドまたはトリペプチド）に分解し、他のペプチダーゼの作用を受けやすくする可能性を報告している。また、Yoshiokaら⁴⁴⁾はアミノ酸の1つであるプロリンを1つまたは2つ含むペプチド（Bz-Gly-Ala-ProおよびBz-Gly-Pro-Leu-Ala-Pro）を用い、ラット小腸刷子縁に存在するジペプチジルアミノペプチダーゼⅣ（DAPⅣ，E.C.3.4.14-），Proline-specific carboxypeptidase（carboxypeptidase P，E.C.3.4.12-）およびACEによるこれらのペプチドの加水分解能につ

いて検討し、生体内におけるプロリン含有ペプチドのACEによる加水分解の可能性を報告している。更に、カゼイン、グリアジンおよびコラーゲンはプロリンを豊富に含むタンパク質であるが、これらのタンパク質は胃並びに膵液中の消化酵素により効果的に小さなフラグメントに分解されると考えられているが、プロリンとの結合部位はこれらの酵素に対して抵抗性を示す。従って、消化酵素により分解された小フラグメント（プロリン含有ペプチド）は小腸刷子縁上に存在するACE, DAP IVそしてカルボキシペプチダーゼP等によりジペプチドやアミノ酸に分解された後、生体内に吸収されると推定されている。小腸ACEは小腸粘膜表面に局在することことから、タンパク質の消化酵素として働く可能性も否定できないが、この点に関しては、小腸におけるACEの”真”の基質の探索も含め今後の研究が必要であろう。

V. 結語

ヒト小腸アンギオテンシ変換酵素 (ACE) 活性は, 単位重量あたりでは腎臓, 肺, 精巣, 精巣上体に次いで高く, 総重量あたりでは腎臓, 肺に次いで高い値を示した. 剖検時採取ヒト小腸において, ACE性の90%以上が105,000xg上清中に見い出され, ゲルカラムクロマトグラフィー上で2~3種の分子サイズを示した. 剖検時採取ヒト小腸ホモジネートの13,000xg遠心上清より硫酸分画法, lisinopril-linked Sepharose 6B カラムクロマトグラフィー法および Sephacryl S-300 HR カラムクロマトグラフィー法を用いてACEを精製した. Lisinopril-linked Sepharose 6BクロマトグラフィーにおけるACEの精製度は約1,528倍であり, 最終回収率は約20% (P-I)であった. 単離されたACE (P-I) および部分精製されたP-IIの分子量は8.0%SDS-PAGE法およびウェスタンブロッティング法において, それぞれ180 kDaおよび100 kDaを示した. 人

工基質 HHL に対する比活性は, P-I : 156 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ であった. K_m 値は, P-I : 1.75 mM, P-II : 1.68 mM であった. 一方, 人工基質 HGG および 内在性基質 アンギオテンシン I および ブラジキニン, 並びに オピオイドペプチド [Met⁵]-および [Leu⁵]-エンケファリン に対する P-I の分解能について検討したところ, 各基質は ACE (P-I) により分解を受け, 遊離したペプチドは, ODP-50 カラムにて完全に分離された. 分離された各ペプチドの標品およびアミノ酸分析により, HHL および アンギオテンシン I より His-Leu が, HGG より Gly-Gly が, ブラジキニン より Phe-Arg が, [Met⁵]-エンケファリン より Phe-Met が, そして [Leu⁵]-エンケファリン より Phe-Leu がそれぞれ確認された. HHL 以外の各基質に対する P-I の K_m 値は, HGG : 7.5 mM, アンギオテンシン I : 39.5 mM, ブラジキニン : 1.0 μM , [Met⁵]-エンケファリン : 1.0 mM および [Leu⁵]-エンケファリン : 1.0 mM であった. P-I および II の活性は, 酵素反

応系からの Cl^- の除去および特異的阻害剤カプトプリルの添加により阻害された。なお、活性発現に必須とされる Cl^- の至適濃度は、P-I : 0.8 M, P-II : 0.6 M, 至適 pH はいずれも 8.3-8.5 であった。

抗ヒト腎臓 ACE 抗体を用い、P-I および II について、免疫学的検討を行った。二重免疫拡散法では、P-I および II はいずれも明瞭な一本の沈降線が得られ、かつ互いに融合すると同時に、それらはまた、ヒト腎臓 ACE の沈降線とも完全に融合した。また、同抗体による活性阻害試験では、P-I および II いずれも添加抗体量に依存する、残存活性の減少が見られ、しかも双方の阻害曲線はほぼ一致した。さらに、ウェスタンブロッティング法にて本抗体による ACE の検出を行ったところ、P-I (180 kDa), II (100 kDa) および腎臓 ACE (170 kDa) の明瞭なバンドが検出された。

以上から、ヒト小腸から精製されたの 2 種の ACE (P-I および II) は、分子量および活

性発現に必要とされるCl⁻の至適濃度に若干の差異が認められるが、至適pHや基質HHLに対するK_m値は類似し、さらに、特異的阻害剤カプトプリルによる阻害も同じ様式を示すことから、P-IおよびIIは類似した酵素化学的性状を有するものと考えられた。また、抗ヒト腎臓ACE抗体を用いた免疫化学的検討の結果から、これらの2種のACEは腎臓ACEとも非常によく類似する抗原性を有していると考えられた。

V I. 謝辞

本研究について御指導頂いた弘前大学医学部法医学教室村上利教授に深く感謝の意を表します。

文 献

1. Yang, H.Y.T., Erdos, E.G. & Levin, Y.: A dipeptidyl carboxylase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. Biochim. Biophys. Acta, 214:374-376, 1970.
2. Ondetti, M.A., Rubin, B., & Cushman, D.W.: Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. Science, 196: 441-444, 1977.
3. Patchett, A., Harris, E., & Tristram, E.: A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. Nature, 288:280-283, 1980.
4. Lieberman, J. & Sastre, B.S.: Angiotensin-converting enzyme in post-mortem human tissues. Lab. Invest. 48:711-717, 1983.

5. Sande, M.V. & Neels, H.M.: Multiple forms of angiotensin-converting enzyme in human tissues and fluids J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 23: 381-386, 1985.
6. Vane, J.R.: The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. Br. J. Pharmacol., 29: 209-242, 1969.
7. Cohen, M.L., Wiley, K.S. & Kurz, K.D.: Effect of acute oral administration of captopril and MK-421 on vascular angiotensin converting enzyme activity in the spontaneously hypertensive rat. Life Sci., 32:565-569, 1983.
8. Norman, J.A., Lehmann, M., & Goodman, F.R.: Central and peripheral inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) in the SHR: Correla-

tion with the antihypertensive activity of ACE inhibitors.

Clin. and Exper.-Theory and Practice, A9(2&3):461-468, 1987.

9. Erdos, E.G., Johnson, A.R. & Boyden, N.T.: Hydrolysis of enkephalin by cultured human endothelial cells and by purified peptidyl dipeptidase. Biochem. Pharmacol., 27: 843-848, 1978.
10. Skidgel, R.A., Engelbrecht, S., Johnson, A.R. et al.: Hydrolysis of substance P and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. Peptides, 5:769-776, 1984.
11. Skidgel, R.A. & Erdos, E.G.: Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides

- from the luteinizing hormone-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:1025-1029, 1985.
12. Hayakari, M., Seitou, R., Furugori, A. et al.: An improved colorimetric assay of angiotensin-converting enzyme. Clin. Chim. Acta, 144:71-75, 1984.
13. 平野 久, :タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー(Ⅱ).化学増刊117号,池中徳治・崎山文夫共編:37-44, 1990.
14. Bull, H.G., Thornberry, N.A., & Cordes, E.H.: Purification of angiotensin-converting enzyme from rabbit lung and human plasma by affinity chromatography. J. Biol. Chem., 260:2963-2972, 1985.

15. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227:680-685, 1970.
16. Knudsen, K.A.: Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. *Anal. Biochem.*, 147:285-288, 1985.
17. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 76:4350-4354, 1979.
18. Bohlen, P., Stein, S., Dairman, W. et al.: Fluorimetric assay of proteins in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155:213-220, 1973.