

신생 쥐 간의 Progesterone 6 α -Steroid Hydroxylase에 대한 연구

조도현·박연희·유연우

아주대학교 공과대학 생물공학과
(1984년 4월 25일 수리)

Study on Progesterone 6 α -Steroid Hydroxylase from New-born Rat Liver

Do-Hyun Jo, Yun-Hee Park and Yeon-Woo Ryu

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Korea

Abstract

Five subcellular fractions were obtained by successive centrifugation from the liver of rats within 6 hours of life and characterized by comparing marker compound or marker enzymes. After incubating 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one with the each fraction, the steroids were analyzed by TLC, GLC and GC-MS.

A 6 α -hydroxylase which hydroxylizes the tetra-hydrogenated compound of progesterone, 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, was localized in the crude plasma membrane fraction, but not in the microsome fraction.

The maximum 6 α -hydroxylation was observed at pH 7.0. While this 6 α -steroid hydroxylase was not able to hydroxylize the progesterone, the 3 α -isomer was hydroxylized at the 6 α -position.

서론

Progesterone의 6 α -hydroxylated metabolites는 임신부 소변에서 Salamon과 Dobriner¹⁾에 의하여 맨 처음 구조가 밝혀진 이래 Fotherby²⁾등, James³⁾등 및 Begue⁴⁾등에 의해서 계속 구조가 밝혀졌으며 더욱이 신생아의 소변으로부터 이 6 α -hydroxylated 대사산물들이 Shackleton⁵⁾등, Eneroth⁶⁾등 및 Anderson⁷⁾ 등에 의하여 확인되었으며 양수에 서도 Peltonen와 Laatikaiman⁸⁾, Peltonen⁹⁾등에 의하여 확인됨으로써 이 화합물의 생성은 태아와

관련이 있음이 확정되었다. 규명된 progesterone의 6 α -hydroxylated 대사산물의 구조적 특성을 보면 progesterone의 Δ^{4-5} 의 이중결합과 C-3의 ketone기가 환원된 tetra-hydrogenation되었거나 더 나아가서 C-20의 ketone기가 환원된 hexa-hydrogenation된 구조에 6 α -hydroxylation이 되었음이 판명되었다.

일반적으로 steroid hydroxylation은 drugs, 공해물질의 hydroxylation과 마찬가지로 microsomal fraction에서 cytochrome P450에 의하여 이루어지는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

한편 fetal liver의 microsome fraction에서는

progesterone 분자 자체에 2 α , 6 α , 6 β , 16 α -hydroxylation이 Cytochrome P450에 의하여 일어나는 것이 밝혀졌으나¹¹⁾ 5 α -reduction 및 C-3 reduction에 관여하는 효소가 이 microsome fraction에 있음에도 불구하고 tetra 혹은 hexa-hydrogenated progesterone 대사 산물에 대한 6 α -hydroxylation에 대하여서는 언급된 바가 없었다.

본 연구에서는 progesterone의 환원물인 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one에 작용하여 fetal type의 대사산물인 3 α/β , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one나 5 α -pregnane-3 α/β , 6 α , 20 α -triol을 생성하는 6 α -steroid hydroxylase의 subcellular localization을 신생쥐 간을 이용하여 밝히는 한편 이 효소의 몇 가지 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

1. Subcellular fraction 준비

생후 6시간 이내의 Rat를 경기도 안양 중앙실험동물실에서 공급 받았으며 4°C에서 간을 절취한 후에 아주 작게 절단하여 시료와 10mM Tris-0.25M sucrose-1mM EDTA-1mM MgCl₂ buffer (pH = 7)를 무게비로 1 : 10으로 Potter type 조직분쇄기로 1400rpm으로 5~7회 상하 운동 후에 연속원심분리 방법을 사용하여 1000g-30초 침전, 1450g-10분 침전 9000g-20분 침전 및 105000g-60분 침전과 105000g-60분 상등액으로 분획하였다.

2. 효소역가 및 fraction 성분분석

단백질 정량은 Lowry¹²⁾의 방법에 따라 소혈청 albumin을 표준으로 하여 정량하였으며, DNA 정량은 diphenylamine을 발색시약으로 하는 Burton¹³⁾이 제시한 방법을 사용하여 sperm whale DNA를 표준으로 하여 정량하였다. Lactate dehydrogenase(LDH)는 NADH를 가하여 Pyruvate가 젖산으로 될 때 340nm에서의 흡광도 감소속도를 측정하여 $\mu\text{mole}/10\text{min}/\text{mg}$ 단백질로 역가를 표시하였고, Succinate-cytochrome C reductase(SCR)는 cytochrome C, Coenzyme Q, Succinate를 가한 후 550nm에서 OD의 증가를 측정하여 $\mu\text{mole}/20\text{min}/\text{mg}$ 단백질로 하였으며¹⁴⁾ 5'-nucleotidases는 (8-¹⁴C)-adenosine-5'-monophosphate를 tracer로 사용하여 생성된 (8-¹⁴C)-adenosine을 active aluminum oxide column으로 분리하여 liquid scintillation counter로 측정하였다¹⁵⁾.

3. Steroid incubation 및 추출

Steroid incubation은 기질인 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one을 ethanol에 녹여서 50 μg 이 되게 가하고 cofactor로 NADPH를 가하여 30분간 incubation한다. 6 α -steroid hydroxylase의 기질 특성을 보기 위한 실험도 동일 조건으로 하였다. steroid추출은 빙초산으로 pH 5.2로 조절한 후에 0.1 M-Acetate bufler (pH 5.2)로 부피에 1/10 가한 뒤에 β -glucuronidase가 1000 Fisherman Unit/ml인 *Helix pommacia* 용액 1ml를 가하여 37°C에서 48시간 가수분해하여 CH₂Cl₂를 동일 부피로 가하여 추출하였으며, 유기용매층을 IN-NaOH와 중류수로 각각 세척한 뒤에 탈수과정을 거쳐 N₂ gas를 통과시키며 증발시켜 TLC 및 GC 분석에 사용하였다

4. Steroid 분석

Silica gel 60F254 plate를 di-isopropylether로 1차 전개시킨 후에 동일 방향으로 di-isopropylether-acetone(4 : 1, V/V)로 2차 전개시킨 다음 해당되는 fraction을 용출하여 gas chromatography 및 gas chromatography-mass spectrometry로 분석하였다. Gas chromatography 및 gas chromatography-mass spectrometry에 의한 분석은 우선 무수 ethanol로 해당 fraction을 용출하여 질소 gas 존재하에 증발시킨 후 DHEA, C24, C32를 가한 후 methoxyaminehydrochloride(10mg/ml, pyridine)을 가하여 60°C에서 하룻밤 반응시킨 후 N₂ gas하에서 증발시킨 후 다시 pyridine 20 μl , BSTFA 70 μl 와 TMCS 10 μl 를 가하여 80°C에서 2시간 반응시켜 methoxime-trimethylsilyl ether(MO-TMS) 유도체로 만들어 분석하였다.

Gas chromatography 조건 (Packard Model 427)

Column : 25m glass capillary 1% SE-30

Temp : 190°C 3°C/min 270°C

Detector : Flame ionization

Injector : All glass solid injector system

Gas chromatography-Mass spectrometry .

(LKB Model 9000)

Separator Temp : 290°C ;

Injector Temp : 250°C

Ionization energy : 28eV ;

Acceleration voltage : 3500V

Carrier gas : He 30ml/min

Ionization mode : electronic bombardment

abolites가, F3에는 20-reduced steroid가, F4에는 기질 및 기질의 3 α -isomer가, F5에를 기질의 C3-OH가 산화된 5 α -pregnane-3, 20-dione이 존재함을 알 수 있다.

결과 및 고찰

1. Steroid의 분석

TLC에 의한 분석은 표준 steroid의 Rf value는 Table 1과 같으며 F1, F2에는 hydroxylated met-

Gas chromatography에 의한 steroid 분석은 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one의 가능한 metabolites의 MO-TMS-ether 유도체의 gas-chromatog-

Table 1. TLC fractionation and Rf values of some reference steroids

| Nature | TLC fraction | Systematic name | Rf |
|---------------|--------------|--|--|
| Hydroxylation | 1 | 3 α , 6 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one | 0.08 |
| | | 3 β , 16 β -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one | 0.18 |
| Hydroxylation | 2 | 6 α -hydroxy-5 α -pregnane-3, 20-dione | 0.30 |
| C20-reduction | 3 | 5 α -pregnane-3 α , 20 β -diol | 0.51 |
| | | 5 α -pregnane-3 α , 20 α -diol | 0.43 |
| | | 5 α -pregnane-3 β , 20 α -diol | 0.50 |
| | | 5 α -pregnane-3 β , 20 β -diol | 0.48 |
| | | 4 | 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one |
| C3-oxidation | 5 | 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one | 0.63 |
| | | 5 α -pregnane-3, 20-dione | 0.82 |

Table 2. Methylene unit of MO-TMS derivatiues of some reference steroids

| TLC Fraction | systematic name | *methylene unit(MU) |
|--------------|--|---------------------|
| 1 | 3 α , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one | 28.79 |
| | 3 β , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one | 29.55 |
| | 3 α , 6 α -dihydroxy-5 β -pregnan-20-one | 28.48 |
| | 3 α , 16 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one | 28.76 |
| | 3 β , 16 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one | 29.60 |
| 2 | **6 α -hydroxy-5 α -pregnane-3, 20-dione | 29.57 |
| | | 30.02 |
| | **6 β -hydroxy-5 α -pregnane-3, 20-dione | 29.44 |
| 3 | 5 α -pregnane-3 α , 20 α -diol | 27.62 |
| | 5 α -pregnane-3 α , 20 β -diol | 27.42 |
| | 5 α -pregnane-3 β , 20 α -diol | 28.49 |
| | 5 α -pregnane-3 β , 20 β -diol | 28.24 |
| 4 | 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one | 27.13 |
| | 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one | 27.98 |
| 5 | **5 α -pregnane-3, 20-dione | 28.02 |
| | | 28.14 |

* : $MU = 24 + \frac{\text{distance from } C_{24}}{\text{distance between } C_{24} \text{ and } C_{32}} \times 8$

** : MO-TMS ether derivatives show 2 peaks, corresponding syn and anti isomer

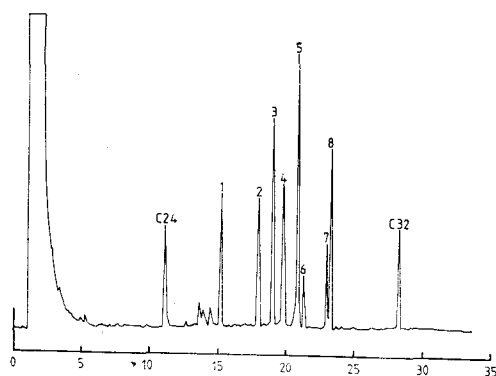


Fig. 1. Gas chromatogram of MO-TMS ether derivative of some references steroids

1. DHEA
2. 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one
3. 5 α -pregnane-3 α , 20 α -diol
4. 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one
5. 5 α -pregnane-3 β , 20 α -diol
6. 3 α , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one
7. 3 β -, 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one
8. 3 β -, 16 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one

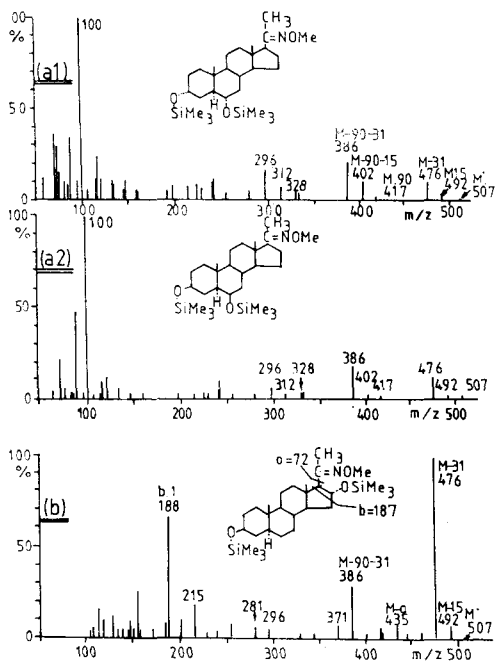


Fig. 2. Mass spectrum of 6 α - and 16 α -hydroxy-5 α -3ol-20-one under the form of MO-TMS ether

- a₁ : 3 α , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one
 a₂ : 3 β , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one
 b : 3 β , 16 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one

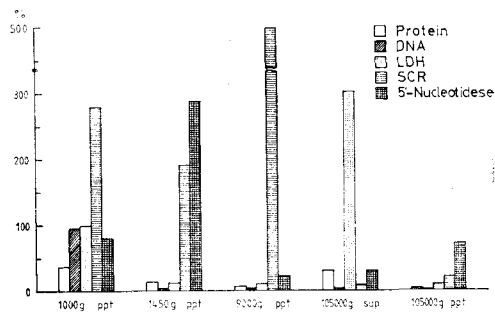


Fig. 3. The distribution of marker compounds and enzymes in subcellular fraction

The content and specific activity of total homogenate are taken as 100%.

ram은 Fig 1과 같으며 methylene unit(MU)는 C 24, C32의 탄화수소를 이용하여 SF-30 1%로 coating된 25m짜리 glass capillary column을 사용하여 구하였으며 Table 2와 같다.

6 α -hydroxylated 및 16 α -hydroxylated metabolites의 MO-TMS ether 유도체의 normalized mass spectrum은 Fig 2와 같다. Fig 2 a₁, a₂에서 보는 바와 같이 6 α -hydroxylated의 경우에는 base peak가 M/Z=100이며 MO-TMS 유도체의 기본 fragmentation M-15, M-31, M-90을 볼 수 있으며 연속적인 2 group의 fragmentation을 볼 수 있다. 즉 M/Z 417(M-90), 402(M-90-15), 386(M-90-31) : 328(M-90-89), 312(M-90 \times 2-15), 296(M-90 \times 2-31), 한편 b에서 보는 바와 같이 16 α -hydroxylated의 경우에는 base peak가 M/Z=476(M-31)이며 M/Z=188에 높은 intensity를 보여주고 있다. 이 M/Z=188의 높은 intensity는 16, 17, 21-hydroxy-pregnanolone의 공통이다.

2. Subcellular fraction의 동정

연속적인 원심분리에 의하여 각 step마다의 marker compound 및 marker 효소의 분포 percentage는 total homogenate를 100%로 했을 때 Fig 3과 같다. DNA를 nuclei fraction의 marker로 succinate-cytochrome C. reductase(SCR)를 mitochondria의 marker로 LDH를 cytosol의 marker로, plasma membrane의 marker는 5'-nucleotidase로 하였을 때,

1000g precipitate(ppt) : nuclei fraction+과피되지 않은 세포

1450g precipitate(ppt) : plasma membrane이

주나 mitochondria도 상당히 들어 있음.

9000g precipitate(ppt) : mitochondria fraction

105,000g supernatant : cytosol fraction

105,000g precipitates(ppt) : microsome fraction

으로 추정하였다.

생후 3개월 정도의 성장한 쥐의 간에서의 아주 정제된 각 fraction에 대한 marker compound 나 marker enzyme의 분포에 대하여 Fleischer와 Kervina¹⁶⁾가 보고한 것에 의하면 succinate-cytochrome C reductase (SCR)이 mitochondria에서 3.5배 정도 농축되었으며 5'-nucleotidase의 경우는 plasma membrane의 경우 30배 가량 농축되었다. mitochondria fraction은 본 실험에서는 4.9배 정도 농축되어서 약간 높은 농축비를 나타낸 반면에 plasma membrane의 marker인 5'-nucleotidase는 2.8배 정도 밖에 되지 않아 이들의 보고한 것과는 아주 큰 차이를 보이고 있다.

한편, Benedetto¹⁷⁾등은 원숭이 간에서 어미 원숭이와 태아 사이의 각 fraction에서의 marker enzyme 및 marker compound의 분포를 조사한 결과 5'-nucleotidase의 경우 plasma membrane에서 2~4배 정도 농축되었으며 반면에 mitochondria fraction에서의 SCR activity는 40배의 높은 농축을 나타내고 있어 대조를 이루고 있다.

5'-nucleotidase의 1450g fraction과 105,000g fraction의 2중적인 분포는 이미 De Duve¹⁸⁾이래 인정되어 왔으며 DNA의 nuclear fraction에 완전히 농축된 것은 잘 알려져 있다.

3. 각 fraction에서의 steroid생성

각 subcellular fraction에서 기질인 3β-hydroxy

-5α-pregnan-20-one은 crude nuclei fraction과 crude microsome fraction에서는 약 60~70%가 남아 있어서 30~40%가 대사 산물로 전환되었으며 반면에 crude plasma membrane, crude mitochondria 및 cytosol fraction에서는 95% 정도 남아서 약 5%가 전환되었다(Fig 4 참조). 또한 각 fraction별 중요 대사산물은 Table 3과 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 nuclei fraction에서의 환원 산물은 분쇄되지 않은 세포에 의하여 행하여진 것으로 추측되며 cytosol fraction에서는 기질의 20α 화합물로 보이는 5α-pregnane-3β, 20α-diol이 너무 불순물이 많아 완전히 확인되지 못했다. Plasma membrane에서는 6α-hydration된 화합물 외에 다른 pregnane-triol을 검출하였고 microsome frac-

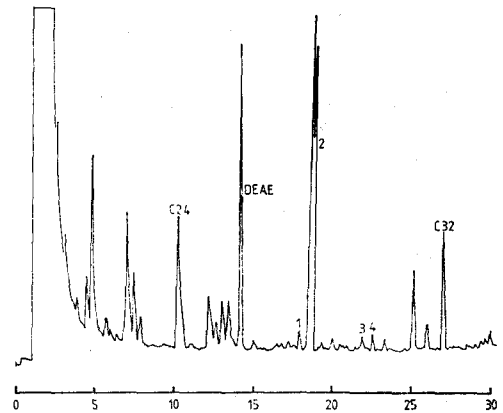


Fig. 4. Gas chromatogram of the extract of the incubation mixture with plasma membrane fraction

- 1 : 5α-pregnane-3α, 20α-diol
- 2 : 3β-hydroxy-5α-pregnan-20-one (Substrate)
- 3 : 3β, 6α-dihydroxy-5α-pregnan-20-one
- 4 : Unidentified pregnane-triol

Table 3. The main metabolites of 3β-hydroxy-5α-pregnan-20-one in the subcellular fraction.

| | main metabolite |
|-----------------------|--|
| crude nuclei | 5α-pregnane-3α, 20α-diol, 5α-pregnane-3β, 20α-diol |
| crude plasma membrane | 3β, 6α-dihydroxy-5α-pregnan-20-one, 5α-pregnane-3α, 20α-diol, a pregnane-triol (UM 29. 85) |
| crude mitochondria | 5α-pregnane-3β, 20α-diol |
| cytosol | 5α-pregnane-3β, 20α-diol(?) |
| crude microsomes | 3β, 16α-dihydroxy-5α-pregnan-20-one, 2pregnane-triols (MU : 28. 63, 29. 85) |

tion에서 16 α -hydroxylation된 화합물과 다른 2개의 triol을 검출하였다.

간 microsome에서의 steroid hydroxylation에 대하여서는 Conney¹⁹⁾의 보고 이래 많은 보고가 있고 Gustafsson¹¹⁾의 총설에 잘 설명이 되어 있어 재론할 여지가 없다 하겠다. 이 hydroxylation은 Cytochrome P450에 의하여 이루어 지는 것으로 밝혀졌다.

한편, plasma membrane의 산화·환원 작용에 대하여서는 Low와 Crane²⁰⁾의 총설에 자세히 설명되었으나 최근에 와서야 plasma membrane의 Cytochrome P450의 존재에 대하여서 Stasiecki²¹⁾등 Sandberg²²⁾등에 의하여 밝혀졌다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 plasma membrane fraction에서 hydroxylase의 활성은 예측될 수 있기도 하며 Desgres²³⁾등 JO²⁴⁾은 배양된 쥐 간세포에서 3 α / β , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one을 생성하는 6 α -hydroxylase가 plasma membrane에 존재함을 밝힌 바 있다. 이로써 fraction fetal state의 marker metabolite인 3 β , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-20-one의 생성에 필요한 6 α -hydroxylase가 신생 쥐간의 plasma membrane에서 존재한다는 것은 fetal state의 microsomal P450 system이 아주 미미한 데도 불구하고 임신중의 progesterone 대사의 9%가 pregnanediol이며 태반과 모체에서 주로 생성되는 한편 6%에 해당되는 6-oxygenated-metabolites가 간에서 생성된 6-oxygenated metabolites라는 것을 고려한다면 6 α -hydroxylase의 plasma membrane fraction localization은 그 의미가 크다 할 수 있겠다.

한편 이 6 α -hydroxylase가 cytochrome P450에 의한 것인지 아니면 P448에 의한 것인지 아니면 다른것에 의한 지에 대한 연구가 더 계속되어야 할 것이며, crude microsome fraction 및 plasma membrane에서의 미확인된 triol에 대한 구조 규명도 더욱 연구가 되어야 할 것으로 생각된다.

4. 6 α -Steroid hydroxylase의 특성

pH의 영향은 incubation용액의 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조절한 뒤에 동일한 방법으로 처리한 결과 pH 7.0에서 가장 높은 activity를 보였다.

기질의 특성은 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one 대신에 progesterone과 3 α -isomer를 crude plasma membrane fraction에 incubation시킨 결과 progesterone으로부터는 3 β , 6 α -dihydroxy-5 α -pregnan-

20-one이 생성되지 않았으며, total 기질의 1% 미만의 구조미상의 mono-hydroxy-progesterone으로 추정되는 물질을 검출하였으며 3 α -isomer로부터는 3 β -isomer의 경우보다 약 50% 적게 6 α -hydroxylation이 되었다.

초 록

신생 쥐 간의 subcellular fraction의 특징과 6 α -steroid hydroxylase의 subcellular localization 및 특성을 살펴본 결과는 다음과 같다.

1000g 30초 침전 fraction은 총 DNA의 95%를 차지하므로써 crude nuclei fraction으로 나타났으며 또한 5'-nucleotidase의 specific activity가 높은 것은 파괴되지 않은 세포에 기인된 것으로 생각이 되며, 1450g 10분 침전 fraction은 5'-nucleotidase의 activity가 가장 높으므로 crude plasma membrane fraction으로 동정하였으나 mitochondria가 같이 침전되어 있었으며, 9000g 20분 침전 fraction은 succinate-cytochrome C reductase의 activity가 가장 높아 mitochondria fraction으로 하였고, 105,000g 60분 상등액은 LDH가 가장 높아 cytosol로 하였으며, 105,000g 60분 침전은 남은 부분으로 microsome fraction으로 추정하였다

각 fraction에 기질인 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one을 incubation시킨 후의 생성된 steroid를 보면 crude nuclei fraction에서는 pregnadiol(5 α -pregnane-3 α / β , 20 α -diol)의 형성으로 20 α -reduction과 3 α -3 β isomerization을 볼 수 있었으며 crude plasma membrane fraction에서는 20 α -reduction과 6 α -hydroxylation을 볼 수 있었으며 crude mitochondria와 cytosol에서는 20 α -reduction만을 crude microsome에서는 16 α -hydroxylation을 볼 수 있었으므로 6 α -hydroxylase는 crude plasma membrane에 존재함을 확인하였다.

한편 6 α -steroid hydroxylase의 최대 활성도는 pH 7에서 나타났으며 progesterone은 hydroxylation을 시키지 못한 반면 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one은 6 α -hydroxylation이 되었다.

사 의

본 연구는 문교부 학술 조성 연구비(1982) 및 한국과학재단 신진연구(1982) 지원으로 수행하였으며, 실험 끝까지 격려와 토론했을 하여 주신 서울대

학교 농과대학 김수일 박사에게 감사드립니다.

引用文獻

1. Salamon, I.I. and Dobriner, K.: J. Biol. Chem., **207**, 322(1954).
2. Fotherby, K., James, S., Kamyab, S., Klopfer, A.I. and Wilson, G.R.: J. Endocrinol., **33**, 133(1965).
3. James, F., Fotherby, K., Nanghton, M.C.: Endokrinol., **55**, 34(1969).
4. Begue, R.J., Desgres, J., Gustafsson, J.A. and Padiou, P.: J. Steroid Biochem., **7**, 211(1976).
5. Shackleton, C.H.L., Gustafsson, J.A. and Sjovall, J.: Steroid, **10**, 269(1971).
6. Eneroth, P., Ferngreen, H., Gustafsson, J. A., Ivemark, B. and Stenberg, A.: Acta Endocrinol., **70**, 113(1972).
7. Anderson, R.A., Chambaz, E.M., Defaye, G., Madani, C., Baillie, T.A. and Brook, C.J.W.: J. Chromatog. Sci., **12**, 636(1974).
8. Pletonen, J.I. and Laatikainen, T.J.: J. Steroid Biochem., **6**, 101, (1975).
9. Peltonen, J.I., Laatikainen, T.J. and Hesso, A.: J. Steroid Biochem., **10**, 499(1979).
10. Cooper, D.Y., Schleyer, H., Levin, S.S., Eisenhandt, R.H., Novack, B.G. and Rosenthal, O.: Drug Metab. Rev., **10**, 153(1979).
11. Gustafsson, J.A.: Method Enzymol., **52**, 377(1978).
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., **193**, 265(1951).
13. Burton, K.: Biochem. J., **62**, 315(1956).
14. Fleischer, S. and Fleischer, B.: Method Enzymol., **10**, 406(1967).
15. Suran, A.A.: Anal. Biochem., **55**, 593(1973).
16. Fleischer, S. and Kervina, M.: Method Enzymol., **31**, 6(1974).
17. Benedetto, J.P., Martel, M.B., and Gat, G.: Biochim. Biophys. Acta **587**, 1(1979).
18. De Duve, C.J.: J. Cell Biol. **50**, 200(1971).
19. Conney, A.H. and Kultch, A.: J. Biol. Chem., **238**, 1611(1963).
20. Low, H. and Crane, F.L.: Biochem. Biophys. Acta, **515**, 141(1978).
21. Stasiecki, P., Oesch, F., Bruder, G., Jarsch, E-E. and Frank, W.W.: Eur. J. Cell Biol., **21**, 79(1980).
22. Sanderg, P.O., Marzella, L. and Glaumann, H.: Exp. Cell Res., **130**, 393(1980).
23. Degres, J., Jo. D.H. and Padiou, P.: 29th Meeting, Eur. Cell Culture Soc., The Netherlands Abstract p.17(1981).
24. Jo. D.H.: Ph. D. Thesis, Dept. of Biochem., Univ. of Dijon, France (1981).