

신경세포의 Myelination에 있어서 Myelin Basic Protein의 Methyl화 현상에 관한 연구

이 향 우 · 전 제 광

성균관대학교 약학대학

(Received June 16, 1987)

Study on the Effects of Methylation of Myelin Basic Protein in Myelination of Nerve Cells

Hyang Woo Lee and Jae Kwang Jeon

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170, Kyunggi-do, Korea

Abstract—It is reasonably well known that there is a relationship between myelin formation and methylation of myelin basic protein in nerve cells. One of the suggestions is that arginine methylation of myelin basic protein could be of aid in the conjugation of myelin protein with the nonpolar lipid to form myelin. Abnormality in methylation of myelin basic protein might induce the neurological diseases in experimental animals as well as in human being. In the biological system, the methylation reaction is catalyzed by protein methylase I using S-adenosyl-L-methionine as methyl donor. In this study, we examined the changes of S-adenosyl-L-methionine concentration and protein methylase I activity in developing rat brain tissues. The results are summarized as followings: (1) In brain tissues of fetus rat, the concentration of S-adenosyl-L-methionine was gradually decreased until to birth. However, the concentration in brain tissues of infant rat was suddenly increased at 7th day (just before myelination occur) birth. (2) Protein methylase I activity was decreased until to birth in brain of fetus rat and increased temporally just after birth. However, the enzyme activity showed no changes around 7th day after birth.

1960년 Einstein¹⁾과 Kies^{2,3)}가 myelin으로부터 중요한 단백질인 myelin basic protein (MBP)을 발견한 이후 이 임기성 단백질인 MBP는 170개의 amino acid로 구성되어 있으며, 특이하게도 107번 위치의 arginine이 methylation된 N^G-methylarginine으로 존재함이 밝혀졌다.^{4,5)} 더 나아가 이 methylarginine은 MBP의 encephalitogenic determinant인 111번부터 121번 amino acid에 인접해 있으며^{6,7)}, 또한 Brostoff 및 Eylar⁸⁾는 99, 100, 101번 amino acid는 proline으로써 MBP의 구조의 굴곡을 이루게 하고, 107번 위치의 methylarginine은 MBP로 하여금 lipid와의 결합을 용이하게 한다고 보고하였다. Baldwin과 Carnegie⁶⁾도 arginine methylation은 비극성인 지방과 MBP

와의 상호결합을 도와준다고 주장하였다.

한편, 위에서 언급한 MBP의 methylarginine은 protein methylase I이라는 효소에 의하여 생성됨이 Paik 및 그의 공동 연구자^{9,12)}와 Carnegie¹³⁾ 등에 의하여 보고 되었으며, histone을 기질로 하여 쥐 혹은 생쥐에서 myelin formation 과정 중 protein methylase I 활성도 변화를 검색하였으나 별다른 연관성을 발견하지 못하였다. 그러나 Lee¹²⁾ 등은 histone을 methylation하는 protein methylase I과 MBP를 methylation하는 protein methylase I은 아마도 서로 상이한 효소임을 주장하였으며, 또한 최근 Paik 등도 wheat germ 으로부터 정제된 protein methylase I은 histone 만 methylation하고 MBP는 methylation하지 않

는다고 보고하여 이 효소의 기질특이성을 시준하였다.¹⁴⁾ Crang 및 Jacobson¹⁷⁾은 척추에서 MBP를 기질로 하는 protein methylase I의 활성도는 methylation의 이런 현상과 잘 부합되어, 분만후 8~45일 사이에 현저한 상승을 나타냈으나 반대로 histone을 기질로 하는 protein methylase I의 활성도는 감소하였다고 보고하여 protein methylation과 myelination과의 상호 밀접한 관계를 시준하였다.

최근 신경성 질환인 subacute combined degeneration(SCD)에 대한 연구결과로부터 MBP의 methylation이 myelin 보존에 중요한 역할을 한다는 많은 증거가 보고되었다. SCD는 사람의 경우에는 vitamin B₁₂ 결핍에 의하여 척추의 myelin sheath의 변성으로 인한 신경성 질환으로써, 실험적으로는 생쥐나 원숭이를 15% N₂O gas가 함유된 공기 중에서 약 10주간 사육하면, 운동실조등을 일으켜 SCD를 유발시킬 수 있는 데^{16,17)} 이때 사료 중에 methionine을 첨가하여 사육하면 N₂O gas 존재하에서도 SCD 발생을 방지할 수 있다고 보고되었다. Jacobson 및 그 공동 연구자들은^{15,18,19)} 생쥐에 methionine과 구조가 유사하여 S-adenosyl-L-methionine의 합성억제 및 methionine의 세포내 이동을 저해하는 cycloleucine을 투여하여 조직학적으로 동일한 실험적 SCD를 유발시켰으며, Small 및 그 공동연구자^{21,22)}들은 cycloleucine에 의한 신경조직 손상은 MBP의 methylation 저해 때문이라고 주장하여 MBP의 methylation과 SCD질병과 밀접한 관계가 있음을 시준하였다.

또한 Crang과 Jacobson^{15,20)}은 cycloleucine이 adenosyl-transferase의 활성도를 억제하여 결과적으로 S-adenosyl-L-methionine의 합성을 저해하고 더 나아가 MBP의 methylation을 억압하여 뇌 및 척추에서 신경조직 손상을 유발시켜 SCD와 동일한 병변을 가져온다고 주장하였다.

S-Adenosyl-methionine (SAM)은 생체내에서 여러가지 중요한 작용을 하는데 그 중에서도 methyl기를 제공하는 methyl donor로서의 작용이 제일 중요한 작용으로 알려져 있다. 핵내에서 DNA 및 RNA의 methylation^{23,24)}, microsome

내에서 phosphatidylethanolamine methylation²⁵⁾ 및 cytosol내에서 단백질의 methylation에 SAM이 methyl donor로서 작용한다.^{26,27)} 최근 Farouqui²⁸⁾ 등은 쥐의 간장세포 및 yeast세포내에서, 작용상으로 구별되는 두 종류의 S-adenosyl-methionine pool이 존재하는 데 그 중 labile pool은 cytosol에 존재하며, stable pool은 간장세포의 mitochondria에, yeast에서는 vacuole에 존재한다고 보고하였다. Labile pool은 보다 더 용이하게 이용되는 S-adenosyl-methionine pool이며, stable pool은 labile pool과 평형을 이루고 있으며, 비교적 stable한 pool이라고 추측하였다.

본 연구에서는 쥐 fetus의 뇌 발달에 따르는 뇌 조직중 SAM 함량변화와 태어난 후 myelination 과정에서의 SAM의 함량변화 및 protein methylase I 활성 변화를 감색하였다. 또한 S-adenosyl-methionine synthetase 활성 억제제의 효과도 감색하였다.

실 험 방 법

실험재료—S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] methionine은 Amersham Rodiochemicals.(U.S.A)로부터 구입하였으며, histone(calf thymus, type II-A)은 Sigma Chemical Comp.(U.S.A)에서 myelin basic protein(MBP)은 Calbiochem.(U.S.A)에서, cycloleucine은 Sigma회사에서 구입하였다. Acetonitrile 및 ammonium formate는 HPLC grade를 Baker(U.S.A)에서 구입하였으며, 그외의 시약은 시판 순수 grade를 사용하였다.

동물의 처치—임신한 쥐를 도살하여 fetus를 채취한 후 fetus의 체중과 fetus의 뇌를 적출하여 그 무게를 달았다. 새로 태어난 신생쥐도 같은 방법으로 뇌조직을 채취하였다. 생쥐를 이용한 실험은 체중 10g 내외의 약 21일된 생쥐에 cycloleucine (5mg/0.2ml saline)을 피하주사한 후 3일후에 뇌조직을 적출하여 실험하였다. 이 뇌조직을 0.25M-sucrose 용액에 homogenation하여 효소의 활성도를 측정하였으며, 1.5N-HClO₄ 용액에 homogenation하여 S-adenosyl-L-methionine을 추출 정량하였다.

Protein methylase I 활성도 측정—Protein methylase I의 활성도는 Durban²⁹⁾ 등의 방법을 약간 수정하여 사용하였다. 즉 총 incubation 양은 0.25ml로써, 0.05ml의 0.5M-phosphate buffer(pH7.2), 0.05ml의 histone용액(30mg/ml), 0.05ml의 효소용액, 0.05ml의 S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C] methionine(5n mole)과 0.05ml의 H₂O를 혼합한 후 37°C에서 10분간 incubation한 후 동량의 30% trichloroacetic acid (TCA)로 반응을 정지시켰다. Acid soluble fraction과 핵산류는 15% TCA 용액을 가한 후 90°C에서 15분간 처치하여 제거하였으며, phospholipid류는 ethanol처치로 제거하였다. 그 잔사를 scintillation vial에 옮긴 후 radioactivity를 측정하였다.

S-Adenosyl-L-methionine(SAM)의 추출 및 정제—실험동물로부터 채취한 뇌 조직을 3~6 volume의 1.5M-perchloric acid를 가한 후 얼마 교반하여 SAM을 추출하였다. 약 1시간 냉장고에 보관후 35,000×g에서 10분간 원심분리 하여 그 상등액을 취하였다. SAM을 함유하고 있는 상등액 1ml을 0.1M-HCl로 equilibrate된 Dowex 50H⁺ column(0.5×4cm, 200~400mesh)에 charge한 후 각각 25ml의 0.1N-HCl, 1.8N-HCl로 차례로 통과시켜서 타물질을 제거하였다.³⁰⁾ 다음 25ml의 6N-HCl을 통과시켜 SAM을 추출하였다. 이 추출액을 30°C에서 감압 증발기를 사용하여 HCl을 제거한 후 0.3ml의 0.1M-ammonium formate(15% acetonitrile 함유) 용액에 녹여 HPLC를 사용하여 정제정량하였다.

HPLC를 이용한 S-adenosyl-L-methionine 순수정제 및 정량—Dowex로부터 추출한 SAM를 순수정제 및 정량을 위하여 Waters HPLC system을 이용하였다. C₁₈ μ bondapak (7.8mm×30cm) column을 시료를 적용하기 전 미리 0.1M ammonium formate buffer (15% acetonitrile 함유)로 equilibrium시킨 후 시료를 injection하였다. 유출속도는 1.2ml/min로, isocratic elution 조건으로 파장 254nm에서 흡광도를 측정하였으며, peak의 넓이로써 시료량을 정량하였다.

실험결과 및 고찰

HPLC를 이용한 S-adenosyl-L-methionine의 확인—SAM 표준물질의 HPLC pattern은 그림 1에서 보는 바와 같이 뚜렷한 SAM peak가

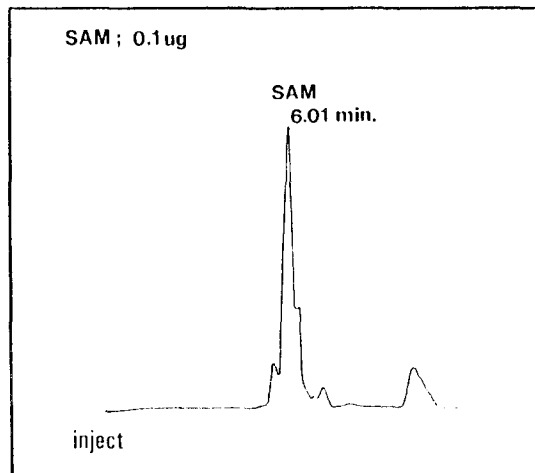


Fig. 1—High performance liquid chromatography of S-adenosyl-L-methionine, column; C₁₈ μBondapak(7.8mm×30cm), mobile phase; 0.1M-ammonium formate buffer containing 15% acetonitrile, flow Rate; 1.2ml/min.

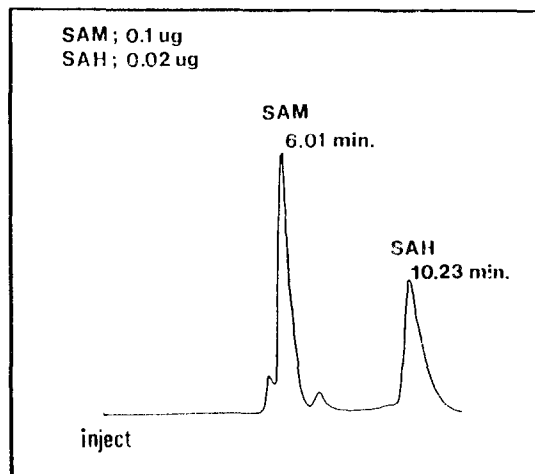


Fig. 2—High performance liquid chromatographic separation of S-adenosyl-L-methionine (SAM) and S-adenosyl-L-homocysteine (SAH). The mixture of SAM (0.1μg) was injected on HPLC. Detailed chromatographic conditions are described under Methods,

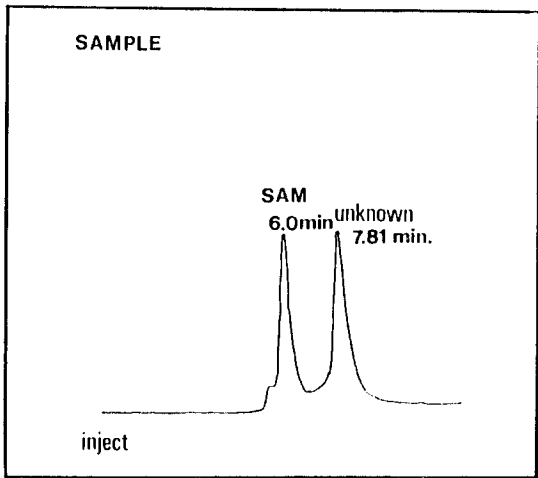


Fig. 3—High performance liquid chromatography of rat brain extract. The perchloric acid extract of the brain tissue was passed through a Dowex 50H⁺ column (0.5×4cm) which was then eluted stepwise with 0.1M, 1.8M, and finally 6M HCl. The 6M HCl-eluent was concentrated and injected on HPLC.

주사후 6.01분에 유출되었다. 이를 더 확인코저 방사선으로 methyl가 label된 S-adenosyl-[¹⁴C-methyl]-methionine을 HPLC에 injection한 결과 radioactivity peak가 6.0분대의 흡광도 peak와 일치하였다(실험 data 생략). 또한 SAM의 분해 산물인 S-adenosyl-homocysteine(SAH)을 혼합한 후 같은 조건하에서 HPLC를 행한 결과 SAH는 주사후 10.23분에 peak가 나타나 SAM와는 뚜렷이 분리되었다(그림 2).

Fig. 3은 위의 뇌조직으로부터 추출, Dowex 50H⁺로 부분정제한 시료의 전형적인 HPLC pattern으로써 SAM은 시료 주사후 6.00분에 나타나고 있다.

뇌조직내 S-adenosyl-L-methionine 농도 변화—Table I 및 Fig. 4에서 보는 바와 같이 체중 변화에 따른 SAM함량변화는 fetus무게 2g 내외 일 때 뇌 1g중 SAM함량은 46.3 nmole이었으나 이는 점차 감소하여 태어날 시기가 가까워 옴에 따라, 즉 fetus 무게 7.5g에서는 28.8 nmole로써 현저한 함량저하를 나타내었다.

신생쥐의 날자변화에 따른 뇌중 SAM 함량변화는 태어난 후 5시간 후의 뇌 1g중 SAM 함량

Table 1—The changes of S-adenosyl-L-methionine concentration and protein methylase I activity in developing rat brain

Age	Body weight ^a (gm)	S-Adenosyl-L-methionine ^a (n mole/gm)	Protein methylase I ^a (pmole/min/mg)
Fetus			
	2.2±0.03	46.30±9.400	ND
	3.7±0.17	32.83±4.865	5.2±0.40
	5.4±0.25	33.27±3.810	6.1±0.26
	7.2±0.26	28.80±2.429	3.4±0.25
After birth			
5 hrs.	6.3±0.46	68.90±3.452	6.2±0.02
1 day	7.6±0.41	28.28±4.872	5.6±0.15
3 days	9.9±0.18	30.82±4.174	3.7±0.23
5 days	16.3±2.05	17.80±1.353	3.5±0.05
7 days	15.0±1.15	49.40±2.256	3.5±0.12
10 days	25.5±1.20	23.00±1.153	2.2±0.05
18 days	36.2±0.20	15.40±2.246	2.7±0.18

^a : Data are means±S.D. of four or five experiments.

은 일시적인 현저한 증가를 보여서 68.9 nmole이었으나 이는 점차 감소하여 5일된 신생쥐 뇌중 SAM은 17.8 nmole로 하강하였다. 그러나 제일차 myelination이 일어나는 시기인(출생후 5~15일) 7일 후에는 다시 49.4 nmole로 급격한 상승을 보인 후 점차 하강하였다.

뇌조직내 protein methylase I 활성도 변화—위의 fetus 및 신생쥐 뇌조직내 protein methylase I 활성도 변화는 Table I 및 Fig. 4에서 보는 바와 같이 체중 3.7g인 fetus에서 활성도

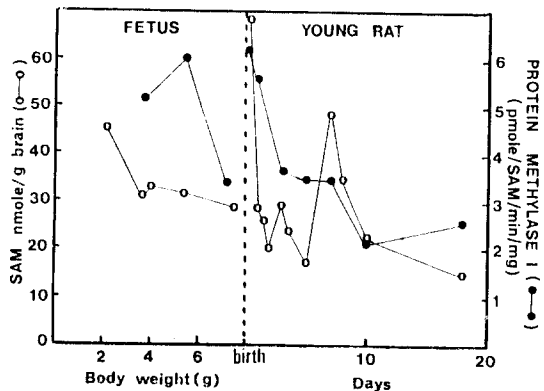


Fig. 4—The concentration and activity change of S-adenosyl-L-methionine and protein methylase I in rat brain during rat brain development.

Table II—Effect of cycloleucine on the concentration of S-adenosyl-L-methionine in mouse brain.

	Normal ^a	Cycloleucine ^a
Body weight (mg)	13.3±1.46	12.2±1.29
Brain weight (gm)	0.27±0.009	0.27±0.012
Protein methylase I (pmole/min./mg)	2.62±0.04	2.33±0.009
S-Adenosyl-L-methionine (nmole)	16.33±0.88	13.75±1.09

^a : Data are means±S.D. of four or five experiments.

5.2 pmole/min/mg였으며, 태어나기 직전인 체중 7.1g의 fetus쥐 뇌조직에서는 3.4 pmole/min/mg으로 급격히 하강하였다. 태어난 후 신생쥐 뇌조직의 효소활성도는 출생후 5 hrs, 일일후에는 각각 6.2 및 5.6pmole/min/mg로써 현저한 활성도 증가를 보였으나 점차 하강하여 18일 후에는 뇌조직 protein methylase I 활성도는 2.7로써 약 50%의 활성도로 나타냈다.

뇌조직 S-adenosyl-L-methionine 농도에 대한 Cycloleucine의 영향—생후 약 21일 되는 생쥐에 피하주사로 cycloleucine (5mg/animal)을 투여한 후 3일후 뇌조직내 protein methylase I 활성도 및 SAM 함량을 검색하였다. Table II에서 보는 바와 같이 효소의 활성도 변화는 통계학적으로 유의있는 변화를 초래하지 않았으나 SAM 농도의 변화는 16.33에서 13.75 nmole/g으로써 약 20%의 함량감소를 나타냈다.

고 찰

중추신경계 myelin 단백질의 약 30%를 차지하고 있는 myelin basic protein(MBP)은 비교적 상세히 연구된 단백질인데 그 이유는 이 단백질을 동물에 주사시 자가면역질환의 일종인 experimental autoimmune encephalomyelitis를 일으키는 성질이 있기 때문이다. 이 MBP의 아미노산 조성을 보면 특이하게도 107번 위치에 methylated arginine을 함유하고 있는데 이같은 methylation은 생체내에서 SAM을 methyl donor로 protein methylase I이라는 효소의 촉매작용을 받아 이루어지고 있음이 밝혀졌다.⁶⁾

SAM은 생체내에서 중요한 methyl donor로써 ATP와 methionine으로부터 S-adenosyl-L-methionine synthetase에 의하여 생합성되어 핵내에서 DNA, ribosomal RNA의 methylation^{23,24)} microsome에서 phosphatidylethanolamine²⁵⁾, 핵 혹은 cytosol에서 단백질의 methylation^{26,27)} 등에 관계하고 있다. Farooqui등은²⁸⁾ yeast와 쥐의 간장세포내 SAM의 분포를 검색한 결과 두 종류의 pool이 존재하는데 세포내에서 용이하게 이용되는 labile pool과 비교적 안전한 mitochondria에 존재하는 stable pool이 존재한다고 보고하여 SAM의 생체내 중요한 작용에 관계함에 따른 그 복잡성을 시준하였다. Gharib 및 공동연구자³¹⁾ 들은 7주 및 36주된 흰쥐의 뇌조직 SAM 농도를 검색한 결과 21.9 nmole 및 18.2 nmole/g이었다고 보고하였으며, 또한 뇌 부위별 농도 차이도 비교하였다.

본 실험결과에 의하면 제 I 포에서 보는 바와 같이 출생전 태아의 뇌조직 SAM 농도는 태아체중 2g내의일 때는 46.3 nmole/g으로써 Gharib 등이 검색한 생후 36주된 쥐의 18.2 nmole/g에 비하여 약 2.5배 이상 높은 SAM농도를 보였으며, 이 농도는 점차 fetus의 체중증가에 따라, 즉 태어날 때가 가까워짐에 따라 점차 감소하여 fetus 체중 7.5g 경우에는 28.8 nmole로 현저한 함량감소를 보였다. 이와 유사하게 protein methylase I 활성도도 5.2에서 3.4 pmole/min/mg로 유의있는 감소를 초래하였다.

Campagnoni³²⁾ 등은 생쥐의 뇌에서 myelination은 두 단계로 나눌 수 있는데 그 첫단계는 생후 5~15일에 일어나며, oligodendroglial 세포의 생성 세포막형성 등을 볼 수 있으며, 생후 16~30일에 일어나는 제 2단계는 뚜렷한 myelin형성을 관찰할 수 있다고 보고하였다. Kim³³⁾ 등은 myelin형성의 결함을 갖고 있는 mutant인 jimpy생쥐 뇌조직내 MBP-specific한 protein methylase I의 활성도를 검색한 결과 생후 18~21일된 mutant생쥐에서 효소활성도가 약 50~75% 감소하였다고 보고하였다. 본 실험결과에 의하면 그림 4에서 보는 바와 같이 histone specific protein methylase I의 활성도는 생후 5시간 정도된 신

생쥐의 뇌조직에서는 6.2 pmole/min/mg으로 높은 활성도를 보였으며, 이 활성도는 점차 떨어져 생후 7일후에는 3.5, 생후 10일 및 18일에는 각각 2.2 및 2.7 pmole/min/mg으로 하강하였다. 그러나 뇌조직 SAM 농도는 매우 흥미있는 양상을 보여주었다. 즉 생후 5시간에서 5일까지는 protein methylase I 활성도와 유사하게 68.9 nmole/g에서 급격히 떨어져 3일 후에는 30.82, 5일후에는 17.8 nmole/g를 보여 주었으나, 생후 7일에는 49.4 nmole/g으로 급격한 상승을 나타내었다. 이는 myelination의 첫단계가 시작되는 시기와 일치하며, histone specific protein methylase I의 활성도는 큰 변화가 없으나 뇌조직중 SAM의 농도증가로 능률적으로 MBP의 methylation을 일으키고 더 나아가 뇌조직 myelination이 원활히 이루어지는 것으로 추측된다. 그러나 최근 Chanderkar³⁴⁾ 등의 보고에 의하면 MBP specific protein methylase I의 활성도는 생후 17일에 현저히 상승된 후 점차 감소되며, 이는 myelination 과정과 일치한다고 보고하고 있다.

Combardini³⁵⁾ 등에 의하여 cycloleucine은 강력한 methionine-adenosyl transfer 반응억제작용이 있음이 보고된 이래 Gandy¹⁾ 등은 생쥐에 840 mg의 cycloleucine을 주사한 결과 동물은 활동성이 저하되고 proprioception이 손상되며, 운동소실, 마비등을 일으켜 1~7주 이내에 모두 사망하였다고 보고하였다. 조직학적으로 cycloleucine에 의하여 myelin sheath의 변성과 전형적인 spongy form의 변성을 초래하여 실험적으로 SCD을 유도할 수 있는 약물로 이용되고 있다.

제 II 표는 생후 21일된 생쥐에 5mg의 cycloleucine을 피하주사후 protein methylase I과 SAM 뇌조직 SAM 농도를 검색한 결과인데 효소의 활성도 변화는 관찰할 수 없었으나 뇌조직 SAM 농도는 16.3에서 13.7 nmole/g으로 약 20%의 함량감소를 가져왔다.

결 론

1) 쥐의 뇌조직내 SAM 농도변화는 fetus 뇌에 있어서는 초기에 비교적 높은 농도에서 태어날

시기가 가까워 옴에 따라 점차 감소하였으며, 생후에는 myelination이 일어나는 시기인 제 7 일경에 일시적인 현저한 상승을 보였다.

2) Protein methylase I 활성도 변화는 fetus 시기에는 SAM 농도 변화와 유사하게 점차 활성도 저하를 보였으나 생후 즉시 다시 상승된 후 점차 계속하여 서서히 활성도 저하를 나타냈다.

3) Cycloleucine 투여로 생쥐 뇌조직 SAM은 약 20% 함량 감소를 초래하였으나 protein methylase I 활성도는 별 변화가 없었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 연구비로 이루어졌으며, 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Gandy, G., Jacobson, W. and Sidran, R.: *J. physiol.* **233**, 1 (1973).
- 2) Einstein, E., Dalai, K.B. and Czejyey, *J. Brain Research* **18**, 35 (1967).
- 3) Kies, M.W., Martenson, R.E. and Deibler, G.E.: in *Functional and Structural Proteins of Nervous System*, 201 (Plenum Press.)
- 4) Eylar, E.H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **195**, 481 (1972).
- 5) Eylar, E.H., Salk, J., Beverige, G., and Brown, L.B. *Arch. Biophys.* **132**, 34 (1969).
- 6) Baldwin, G.S. and Carnegie. P.R. *Science* **171**, 579 (1971).
- 7) Alvor, E.C. JR. *J. Immun.* **61**, 355 (1949).
- 8) Brossoff, S., and Eylar, E.H. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **68**, 765 (1971).
- 9) Paik, W.K. and Kim. S. *J. Biol. Chem.* **243**, 2108 (1968).
- 10) Paik, W.K. and Kim. S.J. *Neurochem.* **16**, 1257 (1969).
- 11) Paik, W.K. and Kim. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 632 (1969).
- 12) Lee, H.W., Kim. S., and Paik, W.K. *Biochemistry* **16**, 78 (1977).
- 13) Jones, G.M. and Carnegie, P.R. *J. Neurochem.*

- 23, 1231 (1974).
- 14) Gupta, A., Jensen, D., Kim, S. and Paik, W.K., *J. Biological. Chem.* **257**, 9677 (1982).
- 15) Crang, A.J. and Jacobson, W., *Biochem. Soc. Trans.* **8**, 611 (1980).
- 16) Dinn, J.J., Weir, D.G., McCann, S., Reed, B., Wilson, P. and Scott, J.M., *Irish J. Med. Sci.* **149**, 1 (1980).
- 17) Scott, J.M., Dinn, J.J., Wilson, P. and Weir, D. G., *The Lancet*, August **15**, 334 (1981).
- 18) Gandy, G., Jacobson, W. and Sidman, R., *J. Physiol.* **233**, 1 (1973).
- 19) Jacobson, W. and Gendy, G., In: *Progress in Neurological Research* (edited by P.O. Behan and F.C. Rose), Tunbridge Wells: Pitman Medical, 211 (1979).
- 20) Crang, A.J. and Jacobson, W., In *Animal Models of Neurological Diseases* (edited by P.O. Behan and F.C. Rose), Pitman Medical, England (1980).
- 21) Small, D.H., Carnegie, P.R. and Anderson, R. McD.: *Neurosci. Lett.* **21**, 287 (1981).
- 22) Small, D.H., Carnegie, P.R. and Stuart, S.J.: *The symposium 1981 of the Foundation for Life Sciences* (edited by A.D. Kidman and J.K. Tomkins) Excerpta Medica, Amsterdam, in press.
- 23) Kalousek, F. and Morris, N.R.: *J. Biol. Chem.* **243**, 2440 (1968).
- 24) Klootwijk, J., Van Den Bos, R.C. and Planta, R.J.: *FEBS Lett.* **27**, 102 (1972).
- 25) Hirata, F., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., jr. and Axelrod: *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 1718 (1978).
- 26) Kim, S. and Paik, W.K.: *J. Biol. Chem.* **245**, 1806 (1970).
- 27) Paik, W.K. and Kim, S.: *J. Biol. Chem.* **245**, 1806 (1970).
- 28) Farooqui, J.Z. LEE, H.W., Kim, S. and Paik, W.K.: *Biochim. Biophys. Acta* **757**, 342 (1983).
- 29) Durban, E., Lee, H.W., Kim, S. and Paik, W. K.: *Methods in Cell Ciology* (G. Stein, J. Stein and L.J. Kleinsmith, eds.), Academic Press, New York, 59 (1982).
- 30) Zappia, V., Galletti, P., Porcelli, M., Manna, C. and Raione, F.D.: *J. Chromat.* **189**, (1980).
- 31) Ghrib, A., Sarda, N., Chabannes, B., Crohehbergar, L., and Pacheco, H.: *J. of Neurochem.* **38**, 810 (1982).
- 32) Campagnoni, A.T., Campagnoni, C.W., Bourre, J. -M., Jacque, C. and Baumann, N.: *J. Neurochem.* **42**, 733 (1984).
- 33) Kim, S., Tuck, M., Kim, M., Campanoui, A and Paik, W.K.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **123**, 468 (1984).
- 34) Chandekar, L., paik W.K. and Kim, S.: *Biochem. J. inpress.* (1987).
- 35) Lombardini, J.B., Coulter, A.W. and Talalay, P.: *Mol. Pharmacol.* **6**, 481 (1970).