

신장 조직의 브라디키닌 결합부위 발현

정성현* · 정지창*

경희대학교 약학대학 약물학교실, *경희대학교 의과대학 약리학교실

(Received July 5, 1994)

Expression of Bradykinin Binding Sites within the Mammalian Kidney Tissues

Sung Hyun Chung* and Jee Chang Jung*

College of Pharmacy, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

*College of Medicine, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract—Based upon the previous experiments showing that kidney and lung tissues of rat had relatively abundant bradykinin binding sites, we tried to characterize and determine the densities of the bradykinin binding sites in the rabbit kidney tissue and proximal tubular cells under different growing conditions. Among the kidney tissue renal medulla segments showed the highest bradykinin binding sites. To determine which growth factors are to add in the serum free culture medium to express selectively the bradykinin binding sites in the rabbit kidney proximal tubular cells, we tried so called hormone-deletion approach and in here insulin, hydrocortisone, transferrin, triiodothyronine and prostaglandin E₁ are examined. By performing receptor binding assay and determination of protein concentrations, we may conclude that the most required hormones in the expression for bradykinin binding sites are insulin and transferrin, and fetal bovine serum is shown to be less effective in this regard.

Keywords □ Bradykinin, binding sites, growth factor, proximal tubular cell.

1949년 Rocha e Silva등¹⁾에 의해 혈액에서 발견된 브라디키닌은 적출장관을 서서히 지속적으로 수축시키는 활성이 있다고 하여 이름지어진 물질로 체내에서 다양한 작용을 나타내고 있다. 첫째, 강력한 혈관확장작용을 나타낸다. 이 작용은 내피세포유래 이완인자(endothelium-derived relaxing factor)로 알려진 nitric oxide에 의해 매개되는 경우^{2,3)}와 일부 다른 혈관에서는 프로스타글란딘에 의하여 혈관확장작용이 매개 혹은 증강됨이 관찰되고 있다. 둘째, 장관 자궁 및 기관지평활근을 지속적으로 수축시키는 활성이 있다. 셋째, 브라디키닌이 아직까지는 염증질환의 주요 매개체 라고 하는 확실한 실험근거는 없었으나 통각신경섬유를 직접적으로 자극하여 혹은 프로스타글란딘을 통해 간접적으로 신경섬유를 감작시켜 통

각과민을 유발시키고⁴⁾ 그의 모세혈관투과성의 항진 및 혈관확장 등의 염증반응을 일으키는 작용이 있으므로 보아 염증질환을 일으키는 원인물질중의 하나라고 추측된다.⁵⁾

신장내에서 신혈관의 긴장도조절 및 세뇨관수송에 직접 관여하여⁶⁾ 또는 항이노호르몬이나 프로스타글란딘을 통해⁷⁾ 간접적으로 혈역학 및 Na⁺/H₂O 배설 조절에 주요 역할을 하는 것으로 추측되는 renal kallikrein-kinin system의 보다 구체적인 생리적 및 병리적 작용을 규명함으로써 신장에서 브라디키닌과 관련된 질병 혹은 병적상태를 표적으로 하는 치료제를 개발할 목적으로 본 연구에서는 신조직 및 근위세뇨관부위에 있는 브라디키닌수용체의 결합특성을 여러 배양조건하에서 실험하였다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

실험재료

시약-[2,3-propyl-3,4-³H]Bradykinin(52-81 Ci/mmol)은 Du Pont-New England Nuclear에서 구입하였으며, bradykinin, TES(Trimethyl-aminoethanesulfonic acid), DTT, polyethyleneimine, 1,10-phenanthroline, bacitracin, bovine serum albumin, transferrin, insulin, trypsin EDTA, hydrocortisone 등은 모두 Sigma로부터 구입하였다. 한편 세포배양에 필요한 분말배지인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 및 Ham's F12는 Life Technologies로부터 구입하여 사용하였다. 그외 브라디키닌이 assay도중 분해되는 것을 방지하기 위해 사용한 captopril은 보령제약으로부터 공급받았고 GF/B glass membrane filter는 삼진화학으로부터 구입하였다. Iron oxide용액은 Cook, Pickering의 방법¹⁰⁾에 준하여 조제하여 사용하였다. 그외 인산완충액용액 조제를 위해 사용한 시약 및 기타 다른 시약들은 시판 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

기기-Manifold filtration apparatus(Millipore), Scintillation β counter(Beckman, LS-5000TD), Ultracentrifuge(Sorvall, OTD75B), Spectrophotometer(Hitachi, U-3210).

실험방법

신장조직으로부터 membrane particulate의 제조 및 수용체 결합실험-조직 세포막 particulate의 제조와 수용체결합실험은 Manning 등⁹⁾의 방법을 약간 수정한 후 사용하였는데 그 과정을 요약하면 다음과 같다. 토끼신장의 수질부위를 1 mM 1,10-phenanthroline 함유 25 mM TES완충용액(pH 6.8)에서 균질화시킨 후 50,000 g에서 10분간 두차례 원심분리하여 얻은 침전물을 125~500배 볼륨의 수용체결합시 사용하는 assay buffer(25 mM TES, 1 mM 1,10-phenanthroline, 140 μ g/ml bacitracin, 1 μ M captopril, 1 mM DTT, 0.1% BSA)에 resuspend시킨 후 실험 전까지 -70°C의 deep freezer에 보관하였다.

총 500 μ l의 assay buffer에서 1 nM [³H]-bradykinin을 수용체단백질에 표지시킴으로 브라디키닌 결합부위를 확인할 수 있다. 위에서 얻은 200 μ g의 수용체단백질을 [³H]-bradykinin과 함께 25°C에서 90분간 incubation시킨 후 manifold filtration apparatus를 이용하여 감압하에 수용체와 결합한 브라디키

닌과 유리형을 분리하였고 이때 Whatman GF/B glass filter는 4 ml의 차가운 TES완충용액으로 2~3번 수세한 후 여지를 scintillation cocktail용액에 담겨 방사능을 측정하였다.

토끼신장 근위세뇨관세포의 일차배양-토끼신장 근위세뇨관세포의 일차배양은 Chung 등의 방법¹⁰⁾에 준하여 실시하였는데 그 조작을 요약하면 다음과 같다. 2~2.5 kg의 토끼를 cervical dislocation시켜 죽인 후 개봉하여 신장을 얻은 후 신동맥을 통하여 phosphate buffered saline(PBS), DME/F12 medium, 0.5% iron oxide액으로 차례로 관류시켰다. 피질부위를 떼어낸 후 DME/F12 medium으로 균질화시키고 253 및 83 μ nylon mesh를 통과시킨 후 얻은 잔사를 magnetic stir가 담긴 medium액에 옮겨 피질중 사구체부위를 제거하였다. 계속하여 나머지용액에 0.124 mg/ml collagenase와 2.5 mg% soybean trypsin inhibitor를 넣고 incubation을 시켜 불필요한 결합조직들을 제거하였다. 이렇게 하여 얻은 세뇨관들을 항생제를 함유한 DMF/F12 배양액으로 2~3번 씻어 준 후 실험조건에 따라 여러 세포성장 인자(100 ml 배양액에 가하는 각 인자들의 농도: insulin 및 transferrin은 5 mg/ml 용액을 0.1 ml, hydrocortisone은 10⁻⁴M을 5 μ l, triiodothyronine(T₃)은 5 \times 10⁻⁹M 용액을 0.1 ml, PGE₁은 0.5 mg/ml 용액을 0.5 μ l 가함) 들을 포함한 배양액으로 최종 resuspend시킨 후 배양접시에 일정량씩 분주하였다. 24시간후 신선한 배양액으로 갈아주고 그후부터는 2~3일에 한번씩 배양액을 교체하였고 배양 시작한지 10일후에 브라디키닌수용체 binding assay를 실시하였다.

세포를 이용한 브라디키닌수용체 결합실험-신장 근위세뇨관세포를 이용한 브라디키닌수용체 결합실험의 경우 위의 신장조직의 방법과 동일하게 실험하였으며 다만 assay시 isotonic한 상태를 유지시켜주기 위해 TES buffer대신 phosphate buffered saline(pH 7.3; 136.8 mM NaCl, 13.4 mM KCl, 1.46 mM KH₂PO₄, 3.21 mM Na₂HPO₄)을 사용하였다. 결합실험은 2백만개의 세포를 완충용액과 동위원소로 표지된 브라디키닌을 함유한 시험관에 가함으로 시작시켰다. 이때 specific binding수치는 총 결합수치에서 10 μ M의 동위원소로 표지안된 브라디키닌 존재하에 얻은 수치인 nonspecific binding 수치를 빼줌으로 계산하였다.

단백질 정량—Bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Bradford법¹¹⁾에 준하여 실시하였는데 요약하면 다음과 같다. m/당 백만개의 근위세뇨관세포를 원심분리하여 얻은 pellet에 0.5N NaOH 1 ml을 가하여 5분간 끓인 후 여기에 0.5N HCl 1 ml을 가해 중화시킨 다음 50 μl에 증류수동량을 넣은 후 5 ml의 Biorad reagent 5배 희석액을 넣어 한시간 이내에 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

체내에서 브라디키닌의 작용을 매개하는 브라디키닌수용체는 1981년 Regoli 및 Barabe에 의해 적출혈관평활근에 대한 효능제들의 상대적인 친화력에 따라 B₁ 및 B₂형으로 분류하고 있다.⁵⁾ 최근 Farmer 등은 guinea pig의 기도 및 폐조직에서 기존의 수용체와는 다른 새로운 형태의 브라디키닌수용체가 있음을 보고한 바 있고¹²⁾ 그들은 이를 B₃형 수용체라 명명하였는데 아직까지 이 수용체이형의 생화학적, 약리학적 특성은 잘 알려져 있지 않다. 한편 브라디키닌의 체내 주요반응인 혈관확장작용, 혈관투과성의 항진, 평활근의 수축, 통증유발 등을 매개하는 것으로 알려진 B₂ 수용체의 경우 종(species)에 따라 두 종류 이상의 subtype이 존재하는 것으로 추정되고 있다. 예를들어 guinea pig의 경우 조직에 따라 두 종류¹³⁾ 혹은 세 종류¹⁴⁾의 B₂ subtype이 있음이 다른 연구자들에 의해 최근 주장되고 있다.

본 연구실에서는 최근 몇년동안 브라디키닌 결합부위에 대한 연구를 하고 있고 먼저 흰쥐의 각조직에 브라디키닌수용체들의 분포상황을 살펴본 결과 신장과 폐조직이 다른 조직에 비해 브라디키닌수용체를 많이 함유한다는 사실을 보고한 바 있다.¹⁵⁾ 이후 우리는 신장조직내의 브라디키닌수용체의 결합특성 및 그 신호전달기전을 살펴보려 계획하였다.

경희의료원 비뇨기과로부터 얻은 사람의 신장과 토끼 신장조직으로부터 브라디키닌 결합부위를 비교해 본 결과 Fig. 1에서 보듯이 사람의 것이 토끼보다 약간 많은(11.3 vs 9.5 fmol/mg protein) 브라디키닌 결합부위를 가지고 있음이 나타났다. 계속하여 토끼 신장조직을 피질, 수질 및 세뇨관부위로 구분한 후 같은 실험을 해본 결과 브라디키닌수용체가 신수질부위에 가장 많고 반면 신피질이나 세뇨관부위는 수

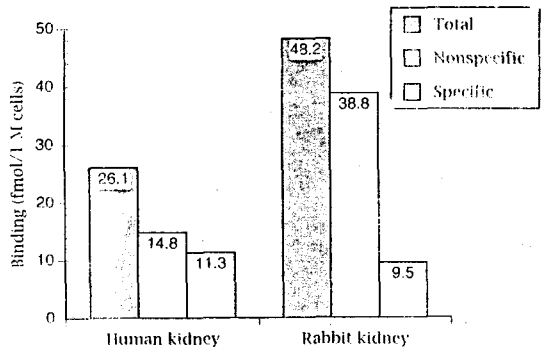


Fig. 1—Comparisons of bradykinin binding sites between the kidney tissues of human and rabbit.

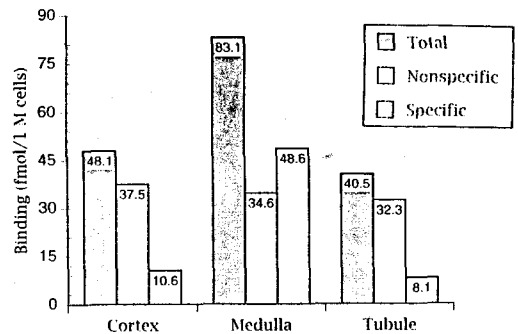


Fig. 2—Comparisons of bradykinin binding sites among rabbit kidney tubule, cortex and medulla segments.

질부위의 1/4~1/5정도 분포되어 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2). 이어 신수질조직을 0.125~5 nM 범위의 여러 농도의 [³H]bradykinin과 함께 25°C에서 90분간 incubation한 실험에서 브라디키닌 농도가 증가함에 따라 수용체에 결합하는 정도가 커지면서 중국에는 특징적인 포화곡선을 나타내었고 이것을 Scatchard plot하였을 때 평형해리상수(Kd)는 0.52 nM 그리고 Bmax는 mg 단백질당 112.5 fmol을 나타내었다.¹⁵⁾ 또한 최근 본 연구실에서는 여러종류의 브라디키닌 효능제(bradykinin, des-Arg⁹-bradykinin, Lys-bradykinin) 및 길항제(D-Phe⁷-bradykinin)를 이용한 실험에서 토끼의 신수질부위에는 1 : 4의 비율로 B₁ 및 B₂ 수용체가 혼재되어 있다는 실험결과를 발표한 바 있다.¹⁶⁾

신장조직을 이용한 실험에서 한 걸음 더 나아가 본 연구실에서는 근위세뇨관 일차배양세포에서 브라디키닌의 신호전달기전을 규명하기 위한 단계로 먼저

여러종류의 세포성장인자들이 신세뇨관세포내의 브라디키닌수용체 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 과거에는 동물 cell line에 대한 배양액으로 Dulbecco's Modified Eagles's Medium(DMEM)에 serum을 첨가한 것이 표준방법이었으나 1975년 Sato에 의해 serum이 첨가된 배양액이 정상세포의 일차배양에 반듯이 최적조적은 아닐것이라는 가설이 주장되었다.¹⁷⁾ 곧 Sato는 배양액내의 serum의 역할은 세포성장에 필요한 인자들을 제공하는 것이라는 생각하에 serum-free culture medium에 다양한 부류의 성장인자들(growth factors, hormones, nutrients, collagen 혹은 fibronectin 같은 cell attachment factors, transferrin 같은 transport binding proteins 등)의 세포성장 혹은 분화촉진 활성을 hormone deletion 방법을 이용하여 검토하게 되었다.

우리는 먼저 많은 세포들이 그들의 성장을 위하여 serum-free medium에 insulin과 transferrin을 필요로 한다는 사실로부터 그리고 Hutchings와 Sato에 의해 HeLa cell 성장에 사용하였던 hydrocortisone 등¹⁸⁾ 세가지 성장인자에 대해 토끼신장 근위세뇨관 세포내의 브라디키닌수용체 발현에 미치는 영향을 검토해 보았다. Fig. 3으로부터 우리는 신장내의 브라디키닌수용체 발현을 위해 basal medium(DMEM + Ham's F12)에 위에서 언급하였던 세가지 성장인자 모두 첨가하였을 때 가장 최적임을 알 수 있었고 세 인자중 특히 insulin과 iron-transport protein인 transferrin이 필수적인 요소임을 확인하였다. 이어서 Hayashi, Sato 등¹⁹⁾이 사용하였던 triiodothyronine(T₃)

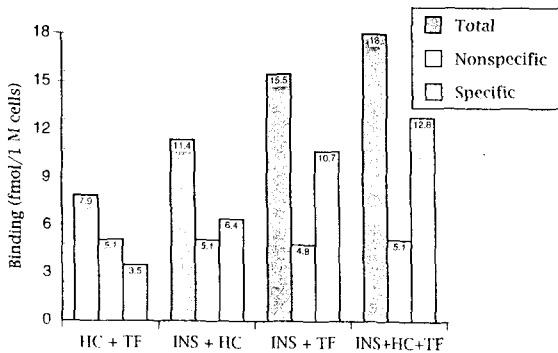


Fig. 3—Effects of several growth factors on the expression of bradykinin binding sites in the rabbit kidney proximal tubule cells. INS, TF and HC denote insulin, transferrin and hydrocortisone, respectively.

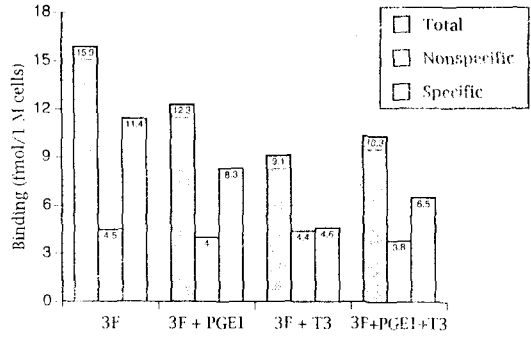


Fig. 4—Effects of PGE₁ and/or T₃ on the expression of bradykinin binding sites in the rabbit kidney proximal tubule cells. PGE₁ and T₃ represent for prostaglandin E₁ and triiodothyronine, respectively. 3F stands for 3 growth factors representing insulin, transferrin and hydrocortisone.

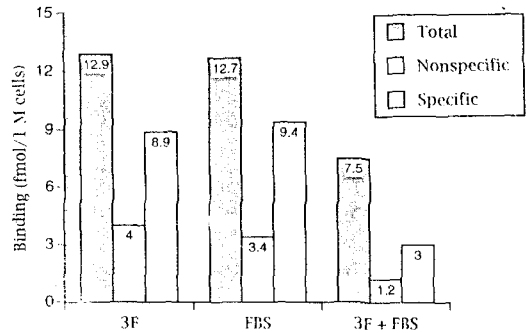


Fig. 5—Effects of 3F and/or fetal bovine serum(FBS) on the expression of bradykinin binding sites in the rabbit kidney proximal tubule cells grown for 1 weeks. 3F stands for 3 growth factors representing insulin, transferrin and hydrocortisone.

과 Taub²⁰⁾에 의해 그 성장촉진활성이 검색되었던 prostaglandin E₁(PGE₁)에 대해서도 같은 활성을 검토해 본 결과 Fig. 4에서와 같이 insulin, transferrin, hydrocortisone첨가시 브라디키닌수용체 발현율을 100%로 볼때 여기에 PGE₁ 첨가군은 73%, T₃ 첨가군은 41%의 낮은 발현율을 나타내어 이 실험결과로부터 토끼신장내 근위세뇨관 일차배양세포내의 브라디키닌수용체의 발현에 최적 성장인자는 insulin, transferrin, hydrocortisone임을 알 수 있었다.

계속하여 세 인자(3F)와 fetal bovine serum(FBS) 간에 브라디키닌수용체의 발현활성을 비교해 본 결과

Table I—Comparison of protein concentrations within the rabbit kidney proximal tubule cells grown in different conditions

Group	Number of cells per 10 μ l	Protein concentration	
		μ g/100 μ l	μ g/1 \times 10 ⁶ cells
G1	34.8 \times 10 ⁴	74	121.6
G2	21.6 \times 10 ⁴	54	250.0
G3	29.3 \times 10 ⁴	49	167.2
G4	24.6 \times 10 ⁴	74	300.8
G5	29.0 \times 10 ⁴	69	237.9
G6	32.6 \times 10 ⁴	74	227.0
G7	43.6 \times 10 ⁴	69	158.0
G8	16.5 \times 10 ⁴	50	303.0

G1: INS+HC; G2: INS+TF; G3: TF+HC; G4: 3F; G5: 3F+PGE₁; G6: 3F+T₃; G7: 3F+PGE₁+T₃; G8: 10% Fetal Bovine Serum

Table II—Differential expressions of bradykinin binding sites in the rabbit kidney proximal tubule cells under different growth conditions

Growth factors added	fmol binding sites/mg protein
Insulin + hydrocortisone	0.030
Insulin + transferrin	0.043
Hydrocortisone + transferrin	0.021
Insulin + hydrocortisone + transferrin(3F)	0.043
3F + prostaglandin E ₁	0.039
3F + triiodothyronine	0.023
3F + prostaglandin E ₁ + triiodothyronine	0.046
Fetal bovine serum(10%)	0.031

Fig. 5는 세포배양 후 일주일에 수용체결합실험을 한 것으로 처음 일주일까지는 FBS가 3F와 비슷한 크기의 활성을 나타낸 반면 2주배양 후 결합실험(data not shown)에서는 3F와 비교하여 전체 생성된 단백질량에는 큰 차이가 없으나(Table I에서 G4 vs G8) 브라디키닌수용체 발현에는 상대적으로 낮은 활성(Table II에서 0.043 vs 0.031)을 나타내었다. 한편 3F와 FBS를 medium에 같이 첨가하였을 때는 수용체발현이 현저하게 감소되었다. 그 이유는 이 조건하에서 세포성장에 필요한 인자들의 농도가 생리적 농도범위에서 벗어나 일어난 결과가 아닌가 추정된다.

끝으로 각 실험조건에서 발현된 총 단백질의 함량을 측정하고 이 수치로부터 세뇨관세포에서 브라디키닌결합부위 발현의 최적조건을 추적해 보았다. Table I 및 II에 정리한 바와같이 총 단백질함량의 경우는 3F와 FBS첨가시 가장 크게 나타난 반면 3F에서 인슐린이 빠진 조건(Table I의 G3)과 3F에 PGE₁, T₃가 첨가된 조건(Table I의 G7)의 경우 단백질생성이 가장

적었다. Table 1의 수치로부터 μ g 단백질당 세포내의 브라디키닌수용체함량을 fmol로 표시해 보았을 때 배지에 insulin과 transferrin이 첨가되는 것이 최적이며, 또한 흥미로운 사실은 3F에 PGE₁과 T₃를 가한 경우에는 전체 단백질발현량은 3F에 비해 50%정도 밖에 안되었지만 브라디키닌수용체의 발현은 3F와 비슷한 수준인 것으로 밝혀졌다.

결 론

첫째, 토끼신장을 세부분으로 나눠 브라디키닌수용체의 수를 비교해 보았을 때 신수질부위가 가장 많은 것으로 밝혀졌다.

둘째, serum free medium에서 여러종류의 성장인자들의 브라디키닌수용체 발현활성을 조사해 본 결과 insulin, transferrin 및 hydrocortisone이 배지에 첨가되었을 때 가장 최적이었으며 한편 이 세인자에 triiodothyronine과 prostaglandin E₁를 더 넣었을 경

우는 생성되는 단백질량이 현저히 감소되어 상대적으로 브라디키닌수용체의 발현을 고려할 때 여러 배양조건중 3F의 경우와 유사한 결과를 나타냈다. 반면 fetal bovine serum의 경우는 위의 세 인자와 비교시 총 단백질합량에는 큰 차이가 없으나 브라디키닌수용체 결합실험시 그 수치가 적어 상대적으로 세 성장인자보다 브라디키닌수용체 발현활성에 있어 나을 것이 없는 것으로 사료되었다.

문 헌

- 1) Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., and Rosenfeld, G.: Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin, *Am. J. Physiol.*, **156**, 261 (1949).
- 2) Peach, M. J., Loeb, A. L., Singer, H.A., and Saye, J.: Endothelium derived vascular relaxing factor, *Hypertension*, **7**, 194 (1985).
- 3) Furchgott, R. F., and Vanhoutte, P. M.: Endothelium derived relaxing and contracting factors, *FA-SEB J.*, **3**, 2007 (1989).
- 4) Steranks, L. R., Farmer, S. G., and Burch, R. M.: Antagonists of B₂ bradykinin receptors. *FASEB J.*, **3**, 2019 (1989).
- 5) Regoli, D., and Barabe, J.: Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.*, **32**, 1 (1980).
- 6) Kauker, M. L.: Bradykinin action on the efflux of luminal ²²Na in the rat nephron. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 119 (1980).
- 7) Carvounis, C. P., Carvounis, G., and Arbeit, L. O.: Role of endogenous kallikrein-kinin system in modulating vasopressin-stimulated water flow and urea permeability in the toad urinary bladder, *J. Clin. Invest.*, **67**, 1792 (1981).
- 8) Cook, W. F., and Pickering, G. W.: A rapid method for separating glomeruli from rabbit kidney. *Nature*, **182**, 1103 (1958).
- 9) Manning, D. C., Vavrek, R., Stewart, J. M., and Snyder, S. H.: Two bradykinin binding sites with picomolar affinities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**(2), 504 (1986).
- 10) Chung, S. D., Alavi, N., Livingston, D., Hiller, S., and Taub, M.: Characterization of primary rabbit kidney cultures which express proximal tubule functions in hormonally defined medium. *J. Cell. Biol.*, **95**, 118 (1982).
- 11) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 12) Farmer, S. G., Burch, R. M., Meeker, S. A., and Willins, D. E.: Evidence for a pulmonary B₃ bradykinin receptor. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 1 (1989).
- 13) Manning, D. C., Vavrek, R., Stewart, J. M., and Snyder, S. H.: Two bradykinin binding sites with picomolar affinities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**(2), 504 (1986).
- 14) Seguin, L., and Widdowson, P. S.: Effects of nucleotides on [³H]bradykinin binding in guinea pig: Further evidence for multiple B₂ receptor subtypes. *J. Neurochem.*, **60**, 752 (1993).
- 15) Lee, E. S., Kim, Y. J., and Chung, S. H.: Characterization of bradykinin receptors of several mammalian tissues. *Bull. K. H. Pharma. Sci.*, **20**, 111 (1992).
- 16) Chung, S. H., Lee, S. Y., and Yun-Choi, H. S.: Bradykinin antagonistic activities of antihistamine agents containing piperazine moiety. *Yakhak Hoeji*, **3** 7(6), 625 (1993).
- 17) Sato, G. H.: The role of serum in cell culture. In biochemical actions of hormones. Vol III edited by G. Litwack pp. 391, *Academic Press, New York* (1975).
- 18) Hutchings, S. E., and Sato, G. H.: Growth and maintenance of HeLa cells in serum-free medium supplemented with hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 901 (1978).
- 19) Hayashi, I., and Sato, G.H.: Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature, Lond.*, **259**, 132 (1976).
- 20) Taub, M., Chuman, L., Saier, M. H., and Sato, G. H.: Growth of a kidney epithelial cell line(MDCK) in hormonally defined serum-free medium. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3338 (1979).