



Title	炭素13核磁気共鳴による絹蛋白の研究
Author(s)	下川, 繁三; Shimokawa, Shigezo
Citation	北海道大學工學部研究報告, 117, 101-109
Issue Date	1984-01-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/41828
Type	departmental bulletin paper
File Information	117_101-110.pdf



炭素 13 核磁気共鳴による絹蛋白の研究

下 川 繁 三
(昭和58年9月30日受理)

^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Study of Silk Protein

Shigezo SHIMOKAWA
(Received September 30, 1983)

Abstract

Carbon-13 nuclear spin-lattice relaxation measurements of liquid silk protein in the silk gland have been made in both native and denatured states. It was found that the relaxation process consists of non-exponential decays for the carbon of glycine in native silk protein. On the other hand, a single exponential decay has been observed for the denatured one. From these results it was suggested that carbon in glycine in the native silk protein takes two different conformations.

要 約

絹糸腺の中にある液状絹蛋白の ^{13}C 核磁気緩和の測定を未変性のものと変性したものについて行った。未変性絹蛋白のグリシンの炭素が二つの指数函数的な緩和過程の減衰を示すことを見出した。他方変性した絹蛋白のグリシンでは炭素のスピン-格子緩和過程は通常の単一の指数函数的減衰に従って生じた。これ等の事実から未変性の絹蛋白にあるグリシンの炭素が二つの異なる状態にあることが示唆された。

序 論

昆虫の中で完全変態を行うものは、その転移の時期に特異なふるまいをすることが知られている。カイコの終齢幼虫はその時期に体内で生合成した絹蛋白を体外に放出して安全な変態の場を作る。我々はこの繭を利用することで数千年にわたりカイコと共存して来た。繊維となった絹蛋白はすでに十分にその構造、機械的性質、アミノ酸の配列等が研究され、その全貌は明らかとなっている¹⁾。しかし化学的には今日なお絹蛋白を合成することが出来ない。カイコの体内に存在する絹蛋白(フィブロイン)は水に溶けて液体として蓄積される。極めて変性しやすく、機械的、化学的方法のいずれの取扱いも困難であった。このため液状絹蛋白の存在状態、あるいはコンホメーションについては最近まで全く調べられていない²⁾。蛋白質の基本的な性質を理解する方法として合成ポリペプチドなどの非水溶液内での構造を溶媒の濃度や性質を変えることで調べられて来た。そしてその多くは水に難溶であり、生体内の蛋白質の運動や構造変化を理解するには甚

だ不十分であった。天然の蛋白質として得られるものは、分子量の増大と共にその複雑さが増大し、分子運動の全容を知ることは極めて困難となる。

本研究は、アミノ酸の組成が明らかで、かつその固体繊維構造が決定されている、天然で最も簡単な非機能性蛋白質の絹蛋白（フィブロイン）について、その生体内の液状フィブロインの運動や構造を調べて見ることにある。特に蛋白質の分子運動を研究する上で最も適切なC-13 NMRの緩和測定(PRFT)を行なった。本研究の主要な部分³⁴⁾は1978年奈良で開催された“生体系の磁気共鳴国際会議”で発表したが、ここではより詳細にその内容を報告する。

絹蛋白はカイコの体内にある細胞器管、絹糸腺の内部で生合成される。第1図はその絹糸線をカイコの体内から取り出して示したものである。電子顕微鏡で見ると後部糸線で生合成されたフィブロインは、腺細胞中のゴルジ体や腺腔内に小球状となって蓄積され⁵⁾⁶⁾⁷⁾ており、これが時間(成長)と共に腺腔内を前方に送り出され、特に中部糸腺中に大量に液状のまま蓄積される。変性した即ち繊維状の家蚕の絹蛋白(フィブロイン)の二次構造はX線回折からいわゆる β 構造の繊維⁸⁾として存在することが確かめられている。最近小林⁹⁾らはフィブロインのCDやORDの測定を塩化リチウム溶液中で行ない、高濃度域で α ヘリクス構造を示す吸収強度が多くなることを報告している。未変性フィブロイン分子の骨格炭素の運動性を調べることはフィブロイン分子の部分的あるいは全体的な運動が如何なるものであるか極めて興味深い。

試料と実験法

試料、叶糸直前のカイコ終齢幼虫より中部絹糸腺を取り出し直ちにリンゲル液に入れ測定に供した。NMR試料管はリンゲル液で満たされている。1回の測定に一对の絹糸腺を用いた。フィブロインは後部糸腺で合成され、後部糸腺はフィブロインのみを含有する¹⁾²⁾中部糸腺はフィブロインとセリシンが存在するが、我々のNMR分光器の感度の問題もあり、測定の場合絹蛋白を大量に含む中部糸腺を用いた。セリシンにはアラニンとグリシンの存在が極めて少ないので測定を妨害することなく、中部糸腺よりの¹³C-NMRスペクトルの感度は極めて良好であった。化学シフトの測定は同軸二重管を用いて外部基準としてTMS(テトラメチルシラン)を用い、その溶媒は重クロロホルムを使用した。各シグナルの帰属はアミノ酸の化学シフトから決めた。スピン格子緩和時間(T_1)の測定は通常のリターン法($180^\circ - \tau - 90^\circ$)を用いプロトン完全デカップリングの条件で行なった。積算は800回~1500回行ない、くり返し時間は2秒である。 T_2 (スピン・スピン緩和時間)の値は線幅から決定した。1回の測定は凡そ1時間を要した。未変性の試料は各々異なる τ の時間について、それぞれ新しい試料を用い、4回の平均をとった。測定温度は302 KでNMRはBruker社のSXP 4-100パルス・FT装置を用い、外部NMRロックシステムとニコレットのBNC-12のミニコンピューター及び高速A-Dコンバーターを用いた。カイコは年に3回飼育出来、叶糸直前の終齢幼虫が糸を出す数時間前に解体処理をする。故に実験は年間を通じ3日である。このた

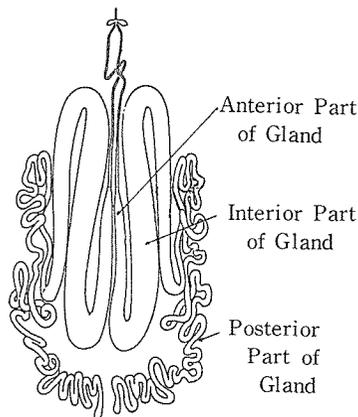


Fig 1. Silk gland of Bombyx mori, posterior parts (Fibroin), interior parts (Fibroin and Sericin), anterior parts (Fibroin and sericin).

め再測定を含めて4年の日数を要した。(飼育期間は1回約28日)。

結 果

絹蛋白はフィブロインとセリシンが7:3の割合で中部絹糸腺に含まれており、フィブロインのアミノ酸組成はGly 42%, Ala 28%, Ser 15%, Tyr 4%であり、セリシンのそれはグリシンとアラニンが極めて少量しか含まれておらず、セリシンの凡そ30%のアミノ酸はセリンである²⁾。このことは観測される¹³C核シグナル中のグリシンとアラニンは主にフィブロイン蛋白由来であることを決定づけるものである。フィブロインのアミノ酸配列は以下のように決定されている²⁾ 即ち、



これは蛋白質分解酵素 CP(carboxypeptitase)によって得られる分割の60%で占められる。最近志村等¹⁰⁾によってフィブロインの分子量は10~17万程度であり、それに2~3万のサブユニットがいくつか含まれる型であると指適された。第2図は中部絹糸腺中のフィブロインの¹³Cスペクトルである。極めて特徴的なことは、絹糸腺中の液状絹蛋白質が非常に分離の良い、シャープなスペクトルを示している。このことは絹糸腺中のフィブロイン分子が極めて早い運動をしているこ

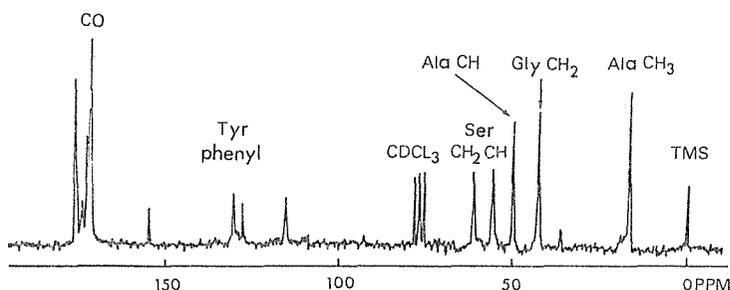


Fig 2. Proton-decoupled carbon-13 nmr spectrum of fibroin (denatured) at 302K and 22.6MHz. Spectrum for interior part of silk glands in Lingers solution. Reference from external Tetramethylsilane (TMS) in chloroform-d₆.

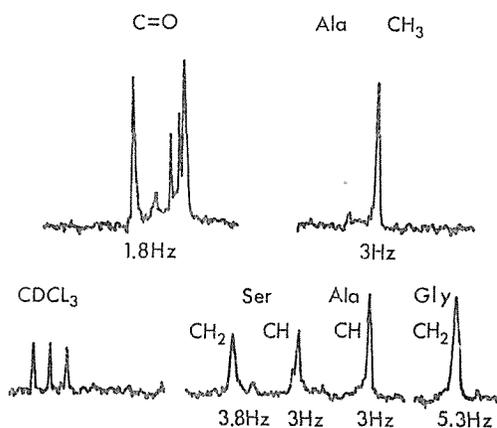


Fig 3. Details of the spectrum given in Figure 1. The value of the line half-widths were determined from the points of the data memory.

とを示している。観測された化学シフトは、高磁場側から、Ala CH₃ 16.7, Gly CH₂ 42.6, Ala CH 49.9, Ser CH 55.5, Ser CH₂ 61.2 ppm と得られた。カルボニル(C=O)の炭素は170~174 ppmにある。線幅の測定は各スペクトルを拡大して記録し、その値は計算機のデータポイントから読み取った。第3図にそれを示す。スペクトルの線幅 ($\Delta \nu$) はそれぞれ Ala CH₃, 3 Hz,

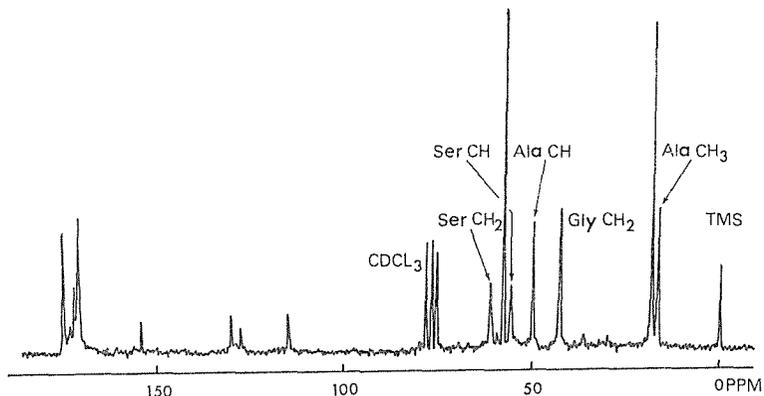


Fig 4. The effect of paramagnetic ion (NiCl_2) on C-13 spectrum of fibroin in Lingers solution.

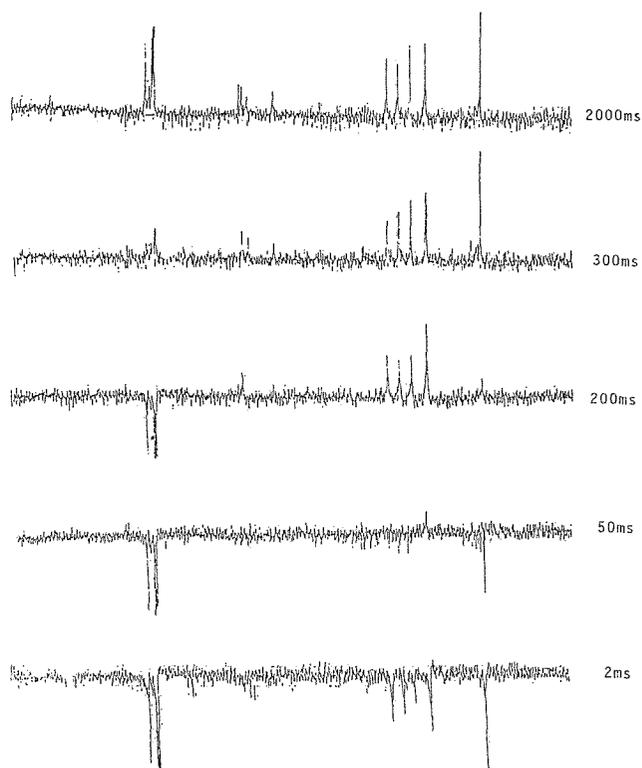


Fig 5. The proton-decoupled natural abundance ^{13}C PRFT nmr spectra of silk protein (Fibroin). Mol wt about 100,000-170,000 at 302K, recorded at 2.1T using 1500 accumulations with a recycle time of 2 sec.

Gly CH₂ 5.3 Hz, Ala CH 3 Hz, Ser CH 3 Hz, Ser CH₂ 3.8 Hz, 及び C=O 1.8 Hz と得た。

第 4 図は常磁性イオンの影響を調べたものを示す。未変性の絹糸線に NiCl₂ の水溶液を注入すると直ちに変性した。この変性したフィブロインの¹³C スペクトルでは、アラニンの CH₃, セリンの CH はいずれも常磁性イオンの影響で二重線 (doublet) に分離した。しかしながらグリシンの CH₂ は何ら常磁性イオンの影響を受けていないことが判る。このように化学シフトについてはグリシンの運動状態に関する情報は得られないことが判った。

第 5 図は¹³C 核スピン—格子緩和の測定を各化学シフトごとに行った (partially relaxed FT 法) ものである。グリシンの C^αH₂ が最も早く緩和していることが判る。測定は未変性試料について 4

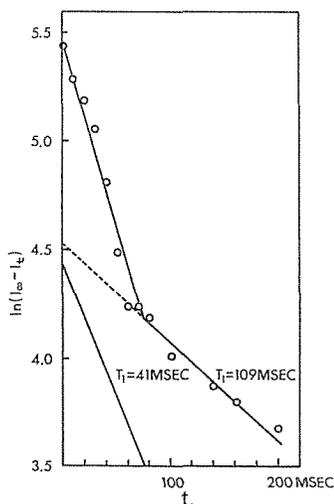


Fig 6. The log of the intensity difference at time t ($I_{\infty} - I_t$) vs t , determined by partially relaxed Fourier transform method for CH₂ of glycine of native fibroin.

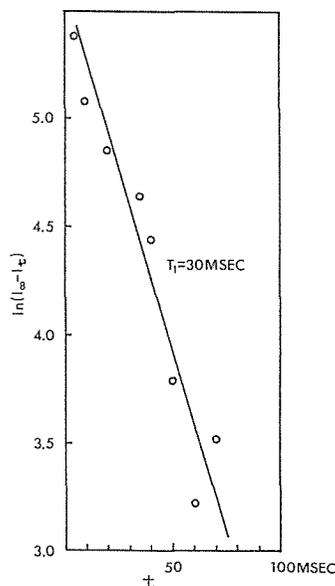


Fig 7. The log of the intensity difference at time t ($I_{\infty} - I_t$) vs t for CH₂ of glycine of denatured fibroin.

回行い、変性したものでは 2 回行なった。第 6 図は 180° パルスによって反転した磁化の強度を各 t ごとに回復過程を $\ln(I_{\infty} - I_t)$ として時間でプロットしたものである。これから判るように、未変性のグリシンでは直線にならずに、二つの傾斜として得られた。このことはグリシンの骨格炭素が単一の緩和過程に従っていないことを示している。他方変性したグリシンは図 7 で見る如く単一の直線として得られ一つの T_1 の値が求まった。実験の再現性は極めて良い。未変性の試料はカイコから中部糸線を取り出してからおよそ 1.5 時間以内に測定した。変性したものは 279 K の温度で 4 日間冷蔵庫に保存したものをを用いた。

考 察

プロトンの結合した¹³C 核の緩和機構は C-H 結合距離が非常に短いのでこの直接結合したプロトンによって引き起される双極子—双極子相互作用による緩和が極めて優勢となる¹¹⁾ この事実からプロトンの付いた¹³C の緩和時間の説明は非常に簡単になる。1968 年から 10 年程はこのこと

を考慮した方法で多くの研究が行なわれた。¹²⁾ Allerhand が指摘した¹³⁾ ように T_1 の値は r_{C-H} の距離と観測周波数によって相関時間の値が大きく変わることが示された。特に巨大分子、蛋白質等の ^{13}C 核の緩和測定では内部運動の自由度が増加すると実験事実との不一致が露呈して来た。このため何人かのグループによって種々のモデルによる計算が試みられて来た。例えば一様拡散モデル¹⁴⁾、制限拡散モデル¹⁵⁾、格子ジャンプモデル¹⁶⁾、あるいはランジュバン型の確率弾導モデル¹⁷⁾、モデルフリー¹⁸⁾ 等々、しかしながら分子量の増大(内部自由度の増加)と共に、計算時間が増加し、巨大分子のようになると対費用の上で実用に供せなくなる。実験家としては最も単純で簡単なモデルを使わざるを得ない。本研究ではフィブロイン分子(分子量 10~17 万)を一つの球と仮定し、主鎖骨格炭素の運動は仮定した球状分子の唯一の運動を反映するとして相関時間を見積ることにした。ただし前述の如く r_{C-H} の距離に関しては $r=1.09 \text{ \AA}$ として計算した。

いわゆるプロトン完全デカップリングの条件では、 T_1 、 T_2 、及び NOE (Nuclear Overhauser Effects) は Solomon にしたがって $T_1=(W_0+2W_{11}+W_2)^{-1}$ 、 $T_2=(U_0+2U_{11}+U_2)^{-1}$ 、 $\text{NOE}=(1+\gamma_H/\gamma_C(W_2-W_0)T_1)$ の如く選移確率の項を用いて記述出来る。¹⁹⁾ 選移確率 W (または U) は分子が等方的な回転運動をしていると仮定するとスペクトル密度 $J(\omega)^*$ を求めることで得られる。ここで $J(\omega)$ は自己相関関数 $G(\tau)$ のフーリエ変換で得られる。この相関関数 $G(\tau)^*$ は Bloembergen によって、 $G(\tau) \propto e^{-t/\tau_R}$ の如き相関時間 τ_R と関係づけられている。²⁰⁾ 我々は T_1 、 T_2 などを用いて上述の τ_R を求める作業を進めることになる。 T_1 、 T_2 、NOE を相関時間 τ_R に対して計算すると T_1 には二つの実解が存在し、 T_2 、NOE は単調減少で一つの τ_R が求められる。通常の実験では T_1 の唯一の τ_R を決定するのに NOE を用いて行なう。しかしながら今回は NOE の測定は時間がかかり試料が変性してしまうので線幅から T_2 を求めることにした。即ちローレンツ型の線型を仮定すると線幅 $\Delta\nu$ は $(\pi T_2)^{-1}$ で表わされる。

スピン-格子緩和速度 (T_1^{-1}) は

$$\frac{1}{T_1} = \frac{N\hbar^2\gamma_C^2\gamma_H^2}{10 r_{CH}^6} \left[\frac{\tau_R}{1+(\omega_C-\omega_H)^2\tau_R^2} + \frac{3\tau_R}{1+\omega_C^2\tau_R^2} + \frac{6\tau_R}{1+(\omega_C+\omega_H)^2\tau_R^2} \right] \quad (1)$$

ここで γ_C と γ_H は ^{13}C と 1H の磁気回転比、 N は直接結合しているプロトンの数、 r_{C-H} は C-H の距離、 ω_C と ω_H はそれぞれの共鳴周波数で、角周波数で与えている。 τ_R は回転再配向の相関時間を表わす。同様にスピンスピン緩和速度 (T_2^{-1}) は

$$\frac{1}{T_2} = \frac{N\hbar^2\gamma_C^2\gamma_H^2}{20 r_{CH}^6} \left[4\tau_R + \frac{\tau_R}{1+(\omega_H-\omega_C)^2\tau_R^2} + \frac{3\tau_R}{1+\omega_C^2\tau_R^2} + \frac{6\tau_R}{1+(\omega_H+\omega_C)^2\tau_R^2} + \frac{6\tau_R}{1+\omega_H^2\tau_R^2} \right] \quad (2)$$

また分子の大きさが比較的小さく、加えてスペクトルが細く鋭い場合には低粘度で活発な分子運動にあることが予想され、その場合には尖鋭化の条件が使って、Kuhlman にしたがって²¹⁾ これを

$$(\omega_C + \omega_H)\tau_R \ll 1 \quad (3)$$

とおくことが出来るから(1)、(2)式はこの条件の場合簡単になって

$$1/T_1 = 1/T_2 = \hbar^2 N \gamma_C^2 \gamma_H^2 \tau_R \sum_i r_i^{-6} \quad (4)$$

となる。分子の回転が、異方性を持ったり、内部運動の自由度がある場合には運動の相関時間は

*強度関数ともいう。 **自己相関関数 $G(\tau) = \overline{F(t)F(t+\tau)}$ のランダム関数で定義されるもので双極子相互作用するスピンの時間反転を表現する。

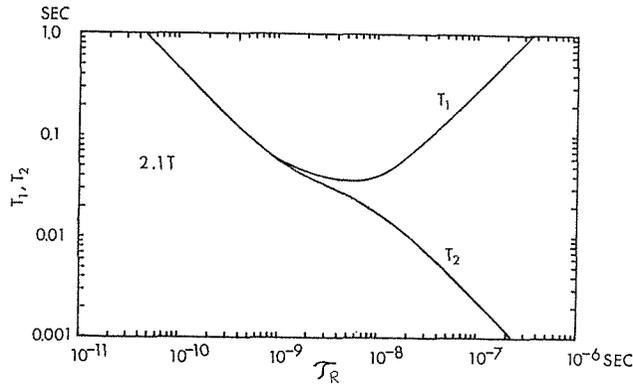


Fig 8. Log-log plot of T_1 , T_2 vs τ_R (both in seconds) for a ^{13}C spin relaxation by a dipolar interaction with C-H distance 1.09 \AA , in the case of isotropic rotational reorientation with complete proton decoupling.

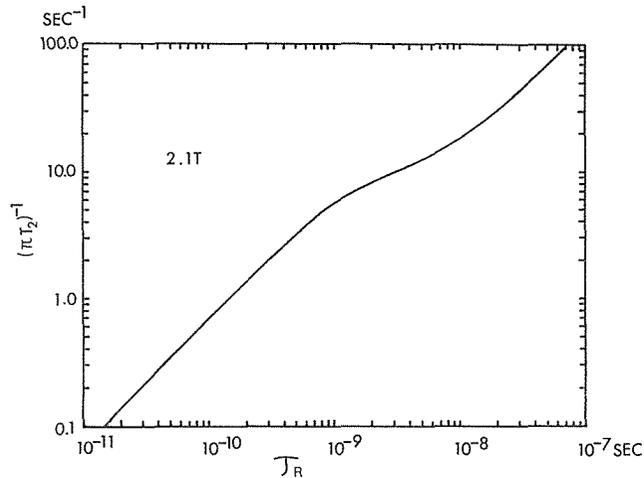


Fig. 9 The plot of $(\pi T_2)^{-1}$ in hertz, vs τ_R in seconds.

唯一でなくなり、複雑になる。本研究の場合フィブロイン分子の運動には内部（側鎖の）自由度を持たないと仮定したので、唯一の分子全体としての回転（球を仮定）運動のみを考慮すればよい。また NOE が求められると、その大きさから、おそい回転運動に関する情報も直接得ることが出来る²¹⁾が、本研究では試料が変性するので NOE からの結果は用いない。

図の 8 は(1)と(2)式から 2.1 T の磁場での T_1 及び T_2 と対応する τ_R を計算したものである。 T_1 の二つの解は T_2 からの τ_R により明らかに決定された。図の 9 は線幅 ($\Delta\nu = 1/\pi T_2$) と対応する τ_R を 2.1 T で計算したものである。

表 I は T_1 , 及び T_2 から得られた τ_R をまとめたものである。フィブロインのアラニンの CH_3 と CH を見ると未変性の τ_R の値の方が変性したものよりも少し小さな値であることが判る。つまり早い運動をしていることが判る。一方グリシンの CH_2 についてのべると、未変性の二つの τ_R は非常に長い相関時間 0.64 ns とその 1/3 の値の 0.22 ns から生じた二つの運動があることが判明した。これは変性すると一種類の 0.99 ns と長い相関時間になる。このことは未変性ではグリシンの $\text{C}^\alpha\text{H}_2$ の炭素の運動が液体的に十分速い部分と、その速さが 1/3 になる固体的に近い遅い部分との二つの運動が重畳しながら T_1 に反映していると見る事が出来る。また変性したフィブロインのアラ

Table 1 Carbon-13 spin-lattice relaxation times, line widths and rotational correlation times of fibroin at 302K.

Protein	Residue	Group	Native ^a		Denatured ^b			
			NT _i (ms), τ_R (ns)	NT ₁ (ms), τ_M (ns)	$\Delta\nu$ (Hz), τ_R (ns)			
Fibroin	Alanine	CH ₃ , CH	136	0.057	106	0.073	3.0	0.074
			121	0.40	80	0.65	3.0	0.47
	Glycine	CH ₂	41	0.64	30	0.99	5.3	0.40
			109	0.22				
Sericin and Fibroin	Serine	CH ₂ , CH	87	0.59	86	0.61	3.0	0.43
			87	0.27	44	0.58		

^aMiddle part of silk gland was taken from a larva at the end of fifth instar and immersed in the Lingers solution and used for measurements immediately. One of the pair of the glands was used for one run of experiment at a given t.

^bDenaturation was made by keeping the samples in a refrigerator at 279K for 4 days.

^cN is the number of hydrogens directly bonded to the carbon.

ニンの τ_R は T_1 から求めた場合と線幅から求めた場合とがよく一致している。しかしグリシンの τ_R の値では両者 (T_1 , $\Delta\nu$) は必ずしも一致していない。この理由はグリシンの T_1 には前述の二つの運動の効果が変性によってある平均の値で遅い運動に移行したのに対して線幅はその観測値が一つの T_2 のみを評価したためと思われる。水に溶かしたフィブロインの構造は高濃度になるにしたがい α ヘリックスを与える量が多くなる (CD, ORD) ことが確かめられている⁹⁾。ただしこれは塩化リチウム存在下であるので、天然の場合とは少し様子が異なると思われる。繊維状 (変性) フィブロインは β 構造を示すことがX線回折により古くから知られている⁸⁾。本研究の結果は未変性フィブロイン蛋白の骨格炭素の運動の中でグリシンのそれが二つの T_1 を持つこと、即ち異なる二つの相関時間 τ_R によって表わされるこ

とから、フィブロイン中のグリシンの構造 (あるいはアミノ酸の配列の仕方に) 二種の状態が存在することを強く示唆するものである。このことはクサカゲロウ (*Chrysopa flava*) の卵 (liquid like) の高角X線回折の結果²²⁾ と対比すると極めて興味深い。この卵の蛋白は β 構造を示し絹蛋白とよくにている。図10の如き結果を得ている。この結果は、クサカゲロウのフィブロインの β 構造の中にグリシンの折りたたまれ方が二種類あることを示している。グリシンの $C^{\alpha}H_2$ のプロトンは、その配向によってシス型とトランス型を示し、アミノ酸の折りたたみの結果局所的に二種の状態 (コンホメーション) を取ることが判明した。絹蛋白の未変性フィブロインもグリシンの極所構造に二種類あるため折りたたみ (運動) の仕方

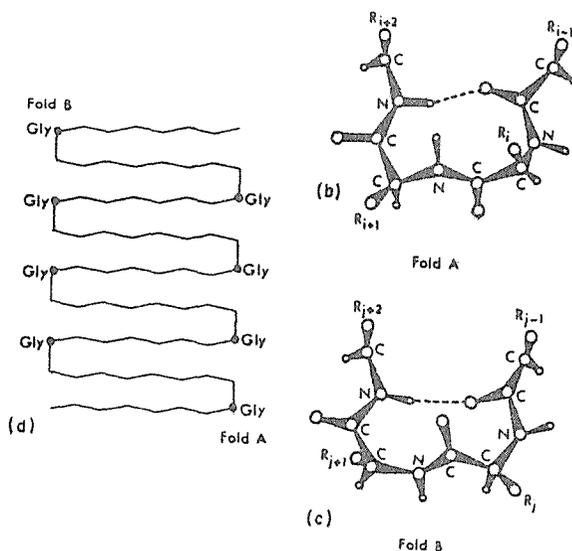


Fig 10. The allowed conformation and crystalline texture in *Chrysopa* egg stalk obtained from high-angle X-ray diffraction analysis. (Geddes et al. 1968)

が二つ出来て緩和に反映したものと考えられる。この事実は化学シフトの結果からは判定出来ない。他の分光学的手段によって再び確認されることを期待するものである。

謝 辞

本研究を通して次の方々に大変お世話になった。北大農学部の蚕学研究室の勝野貞哉氏、中田徴氏には4年にわたりカイコを供給して頂いた。また農林省蚕糸試験所東北支所の杉山多四郎氏、上田金時氏、水田美照氏には人工飼育の蚕を二度にわたり分けて頂いた。東北大学農学部の志村憲助先生(現名誉教授)にはいろいろと有役な助言を頂いた。また夏休みにカイコの飼育を手伝ってくれた私の二人の子供達にも合わせて感謝したい。

References

1. 森 精(編)カイコによる新生物実験, (昭和45年)三省堂
2. R. D. T. Fraser and T. P. MacRae (1973) *Conformation in Fibrous Proteins*, pp. 293-343, Academic Press, New York.
3. S. Shimokawa (1978) VIIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Abstracts pp. 100, Sept. 11, Nara, Japan.
4. S. Shimokawa, (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **747**, 177-181.
5. H. Akai (1971) *Exptl. Cell Res.* **69**, 219-223.
6. H. Akai and K. Kataoka (1978) *Jour. Sericult. Sci. Jpn.* **47**, 273-283.
7. K. Kataoka and H. Akai (1979) *Jour. Sericult. Sci. Jpn.* **48** (2), 171-176.
8. M. Shimizu (1941) *Bull. Imp. Sericult. Exp. Stn. Jpn.* **10**, 475.
9. Y. Kobayashi, T. Fujiwara, Y. Kyogoku and K. Kataoka (1980) 19th Symposium on NMR, Abst. pp. 149-152, Sept. Sapporo
10. K. Shimura, (1978) unpublished results.
11. A. Allerhand, D. Doddrell, V. Glushko, D. W. Cochran, E. Wenkert, P. J. Lawson, F. R. N. Gurd. (1971) *J. Amer. Chem. Soc.* **93**, 544.
12. D. Doddrell, V. Glushko, and A. Allerhand, (1972) *J. Chem. Phys.* **56**, 3683. A. Allerhand, D. Doddrell, and R. Komoroski, (1971) *J. Chem. Phys.* **55**, 189. R. A. Komoroski and A. Allerhand, *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1972) **69**, 1804. A. Allerhand and E. Oldfield, (1973) *Biochem.* **12**, 3428. A. Allerhand, R. F. Childers and E. Oldfield, (1973), *Biochem.* **12**, 1335.
13. K. Dill, and A. Allerhand, (1979) *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 4376.
14. Y. K. Levine, N. Birdsall, A. G. Lee, J. C. Metcalfe, P. Partington, and G. C. K. Roberts, (1974) *J. Chem. Phys.*, **60**, 2890.
15. R. J. Wittebort and A. Szabo, (1978) *J. Chem. Phys.*, **69**, 1722, R. E. London and J. Avitable, (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7159, O. W. Howarth, (1979) *Farady Discuss. Chem. Soc.*, Part 2, **75**, 863, R. J. Wittebort, A. Szabo, and R. R. N. Gurd, (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5723.
16. D. Wallach, (1967) *J. Chem. Phys.*, **47**, 3258, R. E. London and J. Avitable, (1977) *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 7765, A. Tsutsumi and C. Chachaty, (1979) *Macromolecules*, **12**, 429.
17. R. M. Levy, M. Karplus, and P. G. Wolynes (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5998.
18. G. Lipari and A. Szabo (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4546, 4559.
19. I. Solomon, (1955) *Phys. Rev.* **99**, 559 (1955).
20. N. Bloembergen, E. M. Purcell, and R. V. Pound (1947) *Phys. Rev.* **73**, 27.
21. D. F. Kuhlmann, D. M. Grant and R. K. Harris (1970) *J. Chem. Phys.* **52**, 3439.
22. A. J. Geddes, K. D. Parker, E. D. Atkins, and E. Beighton, (1968) *J. Mol. Biol.* **32**, 343.