

組織プラスミノゲン活性化因子

吉 武 新 次*

Tissue Plasminogen Activator

Shinji YOSHITAKE *

Key words : tissue plasminogen activator, 3D structure, zymogenicity, PAI-1 interaction, vampire plasminogen activator, snake venome plasminogen activator

1. はじめに

組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)は線溶に関わる重要なセリンプロテアーゼであり、その諸特性は表 1 のようにまとめられる。アミノ末端よりフィンガー (F)、増殖因子 (EGF)、クリングル 1 (K 1)、クリングル 2 (K 2)、プロテアーゼ (P) の各ドメインから構成される蛋白質であり、これまでに多数の tPA 変異体が作製・解析された結果、ドメイン構造・アミノ酸配列変異と機能の関連性が詳細に明らかにされている¹⁾。立体構造に関しても既に F、F・EGF、K 2、P (一本鎖型、二本鎖型) 各ドメインの構造が NMR 法あるいは X 線結晶解析法により別個に決定され、tPA の機能的特徴が立体構造との関連で説明し得るようになった。また他生物種由来のプラスミノゲン活性化因子のプロテアーゼドメインの構造も決定され、tPA との構造比較がなされている。本稿ではこの最近の知見をもとに立体構造に基づく tPA の機能を紹介することにした。

2. 構造全般ならびにドメイン間の相互作用

構造解析のために使用されている材料は大腸菌あるいは酵母のような非動物細胞において発現された無糖鎖の蛋白質であり、さらに人為的なポリペプチド鎖の巻き戻し操作が加えられている場合もあるが、本来の特性を保持しているようである。EGF ドメインに関しては本シリーズにおいて既に紹介されているが、以下、各ドメインの構造、相互作用を概略する。tPA の F ドメイン、EGF ドメインは既に構造決定されているフィブロネクチン由来の F ドメイン、あるいは X a 因子由来の EGF ドメインと類似し、それぞれの疎水領域を溶媒から遮蔽するように折り畳まっている (図 1,2)^{2,3)}。K 2 ドメインはかなり詳細に構造解析がなされており (図 3)、プラスミノゲンあるいはプロトロンビン由来クリングルドメインとの比較、さらに分子内の低分子リガンド (ϵ ACA, Lysine 等) との結合部位が特定されている。また K 2 の結晶解析実験では結晶の単位包 (unit cell) 中に 3 分子の K 2 が充填され、その中で一方の K 2 の Lys 228 が

*エーザイ株式会社渉外室 [〒 112-8088 東京都文京区小石川 4 丁目 6-10]
Corporate Licensing & International Business Development Eisai Co., Ltd. [4-6-10 Koishikawa, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8088, Japan.]

表1 組織プラスミノゲン活性化因子

別称	(略号) tPA
生理機能	プラスミノゲンを活性化し線溶を促進する。フィブリン等の存在下、この作用が加速される。
分子量	63,000, 65,000 (SDSPAGE還元状態) 59,000 (cDNAからの推定)+糖鎖10%
総アミノ酸残基数	527
ドメイン構造	アミノ末端より、フィンガー (F, アミノ酸残基1~44), 増殖因子 (EGF, 50~87), クリングル1 (K1, 92~173), クリングル2 (K2, 180~261), セリンプロテアーゼ (P, 262~527) の各ドメインから構成される。Fがフィブリンとの結合に強く関与している。Arg275-Ile276間がプラスミンにより水解され二本鎖型に変換される。
糖鎖付加等の修飾アミノ酸	EGF: Thr61にフコース付加。K1: Asn117高マンノース型糖鎖付加。 K2: Asn184に複合型糖鎖付加。この部位に糖鎖が付加していないtPAはフィブリンに対する親和性がより高い。 P: Asn448に複合型糖鎖付加
ヒト染色体上の遺伝子局在部位	第8染色体 8p12
ゲノム構造	32.7 kb, エキソン数14
血漿中濃度	数 ng/ml
欠損症	欠損症ではないがtPA放出異常に基づく静脈血栓症例が報告されている。遺伝子ノックアウトマウスではクロット溶解能等に機能低下が観察されているが、それ以外は正常である。
血漿中の半減期	外部より生体内に注入された場合数分で消失する。内皮細胞表面のマンノースレセプターおよび肝実質細胞表面の蛋白質がtPAのクリアランスに主に関与している。
主な生合成部位	血管内皮細胞
主な局在部位	血中。遊離体およびインヒビターとの複合体として検出される。
レセプターあるいは結合蛋白質	Annexin II, PAI-1, フィブリン等

註) 表の作成にあたり (www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispim?173370) から情報を引用した。

他方のK2のリガンド結合部位に結合している構造が得られており、これは分子間におけるクリングル同士の相互作用様式を示唆しているものと解釈されている^{4)~6)}。tPAのEGF・K1の構造は決定されていないが、これに対応するuPA由来の構造は明らかにされ(図4)、この場合EGF, Kドメインはそれぞれほぼ独立して折り畳まれており、ドメイン間の相互作用は弱いと報告されている⁷⁾。Pドメインは一本鎖型、二本鎖型ともに半径約25Åのほぼ球状構造であり(図5)、5対のジスルフィド結合が存在する。3次元構造上のアミノ酸残基の配置を他種のセリンプロテアーゼと比較した場合、ウロキナーゼ、 α トロンビンに対して相溶性が高い¹⁰⁾。K2とPドメインの相互作用に関しては一本鎖あ

るいは二本鎖K2-P変異体に対するbenzamidin型阻害剤の結合をNMR法により測定するという方式で間接的に研究されている。一本鎖の状態ではPドメインに対して阻害剤が結合し難くなっており、K2との相互作用が強いことが報告されている⁹⁾。

3. プロテアーゼドメイン

3-1 Zymogenicity

tPAは一本鎖の状態で強い酵素活性を有し、いわゆるzymogenという状態が希薄な点がほかのセリンプロテアーゼ凝固・線溶因子には見られない特徴の1つであり、フィブリン等の存在下では特にこの性質が顕著になる。この

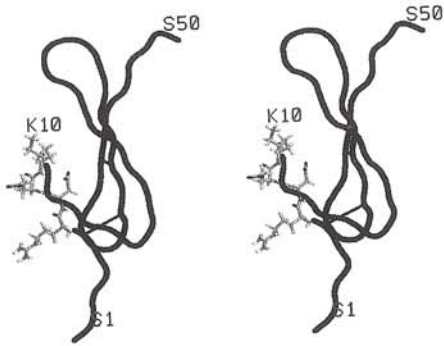


図1 フィンガードメインのステレオ図 (PDB:1TPM, NMR法, エネルギー最小化した平均構造モデル, アミノ酸残基1~50). ポリペプチド主鎖をチューブモデルで, SS結合 (Cys6-Cys36, Cys34-Cys43) を α 炭素間の直線で表示している. フィブリンとの結合に関与している Arg7~Lys10 をボールアンドスティックモデルで表示している.

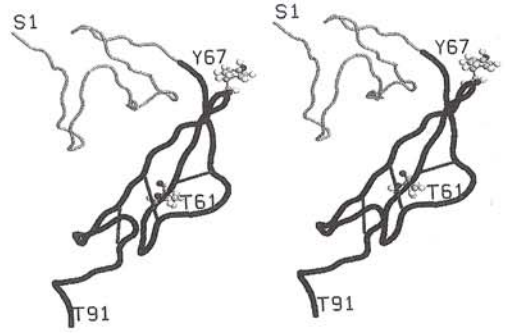


図2 Cys83Ser-tPA 変異体の F・EGF ドメインのステレオ図 (PDB:1TPG, NMR法, 代表的な構造モデル, アミノ酸残基1~91). フィンガー領域 (アミノ酸残基1~45) は細いチューブモデルで表示した. EGF ドメインの SS 結合 (Cys51-Cys62, Cys56-Cys73, Cys75-Cys84) を α 炭素間の直線で, 糖鎖結合 Thr61 ならびに肝細胞レセプターとの相互作用に重要な役割を果たしている Tyr67 をボールアンドスティックモデルで表示した.

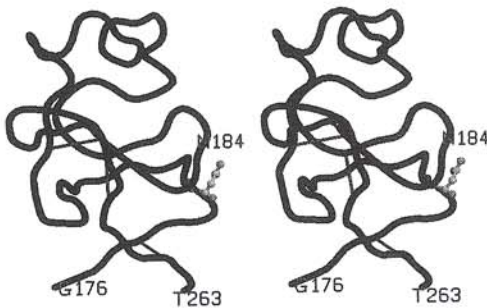


図3 クリングル2のステレオ図 (PDB:1TPK, X線結晶解析, 分解能 2.40 Å, データ中の A 鎖を選択して表示, アミノ酸残基 176~263). SS 結合 (Cys180-Cys261, Cys201-Cys243, Cys232-Cys256) を α 炭素間の直線で, 糖鎖結合 Asn184 をボールアンドスティックモデルで表示した.

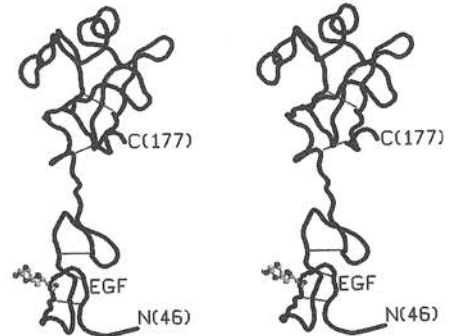


図4 ヒトウロキナーゼの EGF・K ドメインのステレオ図 (PDB:1URK, NMR法, データ中の構造モデル 1 のみを選択して表示, 平均化された構造ではない. アミノ酸残基 6~135). SS 結合を α 炭素間の直線で表示した. 動物細胞を用いて発現されたタンパク質であるので, EGF ドメイン中の Thr18 (tPA の Thr61 に相当) にフコースが付加しており, これをボールアンドスティックモデルで表示した. N(46), C(177) はそれぞれ N 末端, C 末端を表わし, tPA のアミノ酸残基 46, 177 におよそ対応することを表わしている.

zymogenicity に関し一般的には, 一本鎖構造においても活性状態と不活性状態の間で平衡関係が存在し, 内在する構造要因あるいは外因の構造変化により活性状態に平衡がシフトすれば酵素活性が発現するというように理解されている. 一本鎖ならびに二本鎖 tPA のプロテアーゼドメインの構造が解明, 比較されこの現象の構造的説明が加えられた^{9),10)}. tPA では一本鎖状態において既に活性発現に必要な構造, すなわ

ち catalytic triad, オキシアニオンホール, 基質認識部位, を形成・安定化させるような構造要因が存在し, これに加え(あるいは)zymogen 状態を安定化する構造要因が欠如し, これが上記平衡を活性状態へシフトさせているというように説明されている. Catalytic triad を構成する活性中心アミノ酸残基は Ser 478 <195>, His 322 <57>, Asp 371 <102> (<>内の数値はキモトリプシノゲンに基づくアミノ酸番号付け)

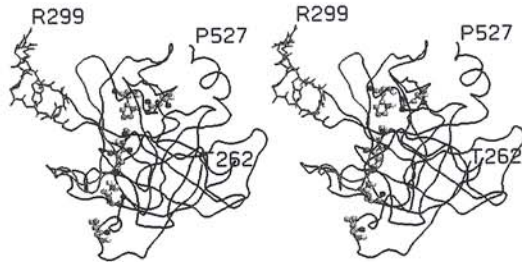


図5 一本鎖 tPA プロテアーゼドメインのステレオ図(PDB:1BDA, X線結晶解析, 分解能 3.25Å, 阻害剤 DNS-Glu-Gly-Arg クロロメチルケトンとの複合体, アミノ酸残基 262~527). 阻害剤配列を除去. ペプチド鎖主鎖を細いチューブモデル表示で, 活性中心を構成するアミノ酸 Ile <16>, His <57>, Asp <102>, Lys <156>, Asp <194>, Ser <195> をボールアンドスティックモデル表示した. 各アミノ酸残基の配向性が図 6 とほぼ同一となるようにモデルを配置した. モデル左側には PAI-1 との相互作用に重要な Lys296~Arg304 領域がワイヤーモデルで表示されている.

であるが, 二本鎖への変換により新たに生じたアミノ末端 Ile 276 <16> のアンモニウム基が Asp 477 <194> 側鎖と塩結合(salt bridge)を形成し活性中心アミノ酸側鎖の配向性を活性状態で安定化させるという解釈が従来のセリンプロテアーゼの活性化様式であり, これはすなわち二本鎖 tPA に見られる構造である(図 6a). しかしながら tPA では一本鎖状態においても Ile 276 <16> の代役を果たし得るアミノ酸残基 Lys 429 <156> が存在し, Lys 429 と Asp 477 の側鎖間に塩結合が形成されるとともに Phe 281 <21> ならびに His 417 <144> の相互作用により活性構造の安定化がなされ, 活性が発現されると解釈されている(図 6b). この特定のアミノ酸残基を変換した Lys 429 Tyr/His 417 Asp-tPA 変異体は実質上 zymogen となり, 一本鎖状態での活性は非常に低いことが示されている^{12,13}. Ile 276 の代替候補として Lys 429 のほか Lys 277 <17>, Lys 416 <143> も挙げられていたが, 構造データからその関与は低いと判断されている. このほかキモトリプシノゲンではいわゆる zymogen triad (Ser 32, His 40, Asp 194 で構成される)と呼ばれる特異的なアミノ酸配置が存在し(図 6e), このアミノ酸残基間の塩結合, 水素結合により zymogen 状態が安定化されていると提唱されているが, tPA ではこの triad に対応するアミノ酸はそれぞれ Ala 292 <32>, Phe 305 <40>, であり Asp

図6 プラスミノゲン活性化因子プロテアーゼドメインのステレオ図. 下記の PDB データより活性中心を構成するアミノ酸残基のみを選択, ボールアンドスティックモデルで表示し各原子の van der Waals 表面をドットサーフェス表示した. キモトリプシノゲンに基づくアミノ酸残基の番号付けを行なった.

- 二本鎖 tPA (PDB: 1RTF, X線結晶解析, 分解能 2.30Å, benzamidine との複合体, アミノ酸残基 A 鎖 1~3/262~275; B 鎖 276~527). 阻害剤ならびに A 鎖を除去した表示. 二本鎖への変換に伴い Ile <16> と Asp <194> の間で塩結合が形成され Lys <156> 側鎖が移動している.
- 一本鎖 tPA (PDB: 1BDA). Lys <156>, Asp <194> 間で塩結合が形成される.
- DSPA α (PDB: 1A5I, X線結晶解析, 分解能 2.90Å, Glu-Gly-Arg クロロメチルケトン阻害剤複合体, アミノ酸残基 1~265). 阻害剤配列は除去して表示. 一本鎖 tPA の構造 b) と類似している.
- TSV-PA (PDB: 1BQY, X線結晶解析, 分解能 2.50Å, Glu-Gly-Arg クロロメチルケトン阻害剤複合体, アミノ酸 1~234). 阻害剤配列は除去した表示. 全体的なアミノ酸残基の配置は二本鎖 tPA に類似している.
- キモトリプシノゲン (PDB: 2CGA, X線結晶解析, 分解能 1.80Å, アミノ酸 1~245). tPA と比較した場合, zymogen triad の存在により, Asp194 側鎖の配向性が変化している.

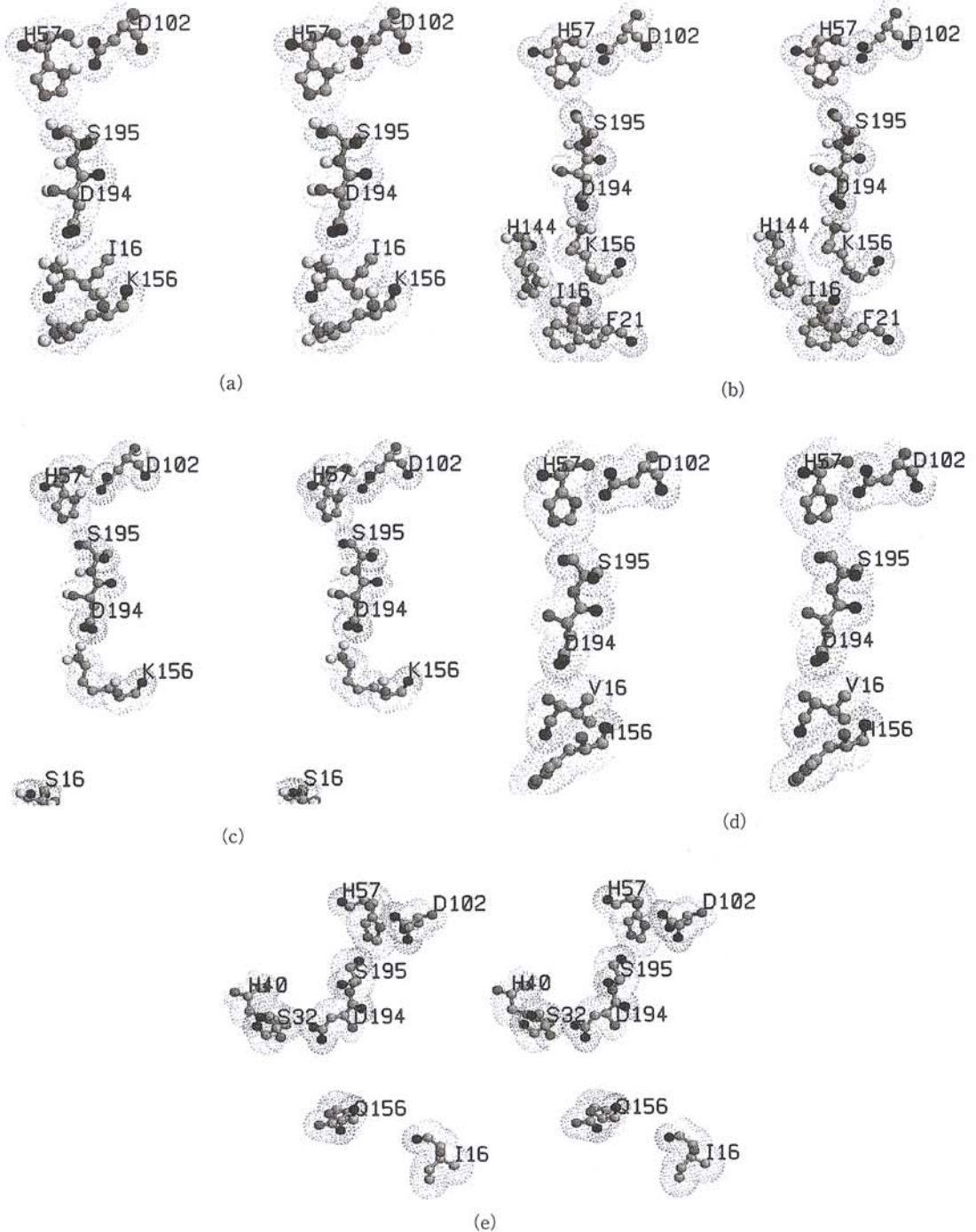


図 6

<194>と有効な結合を形成し得ず、zymogen 状態は安定化されないと考えられている¹¹⁾。この解釈の実験的裏付けとして、zymogen triad を導入した Ala 292 Ser/Phe 305 His-tPA 変異体は予測されたように低分子基質に対してzymogen となっている。

3-2 基質認識, PAI-1 との相互作用

tPA はプラスミノゲン中の Cys 558-Pro-Gly-Arg//Val-Val-Gly-Gly-Cys 566 配列を認識し、特異的に切断する。この領域は Cys 558-Cys 566 間で SS 架橋を形成しているためコンパクトな構造となり tPA と実際にコンタクトし得る領域は Pro 559~Val 563 と予測されているが、tPA の基質結合部位の構造はこの配列を無理なく認識できることを示している¹⁰⁾。低分子阻害剤 benzamidine あるいは bisbenzamidine と二本鎖 tPA 複合体の構造(PDB : 1RTF, 1A5H)によれば基質認識部位は Ile 496 <213>~Cys 502 <220>, Asp 472 <189>~Ser 478<195>, Pro 508<225>~Thr 512<229>, および SS 結合 Cys 474 <191>~Cys 502 <220> から構成される領域により形成されており、特にアミノ酸残基 (側鎖, アミド基, カルボニル基も含む) Asp 472 <189>, Leu 500 <217>, Tyr 368 <99>, Trp 498 <215>, Asp 366 <97>, Thr 367 <98>, Arg 499 <174>, Thr 450 <175> が直接認識に関わっている^{8),14)}。

PAI-1 が tPA のもっとも重要な生理的なインヒビターであることは知られており、tPA/PAI-1 の相互認識部位も主として tPA 変異体を用いた研究により詳細にマッピングされている^{11),17)}。プロテアーゼドメイン中の Lys296-His-Arg-Arg-Ser-Pro-Gly-Gly-Arg304 領域が PAI-1 との重要な認識部位であり(図5)、この領域に存在する Lys あるいは Arg とインヒビター間の塩結合が複合体形成に必須であると考えられている。この領域中の Lys, Arg を Ala あるいは Glu に変換した tPA 変異体は PAI-1 に対する反応性が非常に低下し、Lys 296~Pro 301 を欠失した tPA 変異体は PAI-1 抵抗性を獲得

することが知られている。また Lys 296~Arg 299 を導入されたトロンピンは PAI-1 単独で阻害され、さらには以下に述べる TSV-PA にはこの領域に対応する塩基性アミノ酸配列が存在しない等の事実がこの領域の PAI-1 認識における重要性を示唆している。この領域は分子表面に露出し、また一本鎖、二本鎖 tPA および下記 DSPA α すべてにおいて確定した構造を取り得ない (乱れのある構造、結晶解析において明確な電子密度が得られない) 領域であることが明らかになっており、この構造上の特徴が機能と密接な関係があるのではないかと推測されている^{10),15)}。またこの領域は tPA のフィブリンとの相互作用に重要な役割を担っている領域であることも知られている。

3-3 ほかの生物種由来のプラスミノゲン活性化因子との構造比較

ヒト tPA と類似構造、機能を有するほかのプラスミノゲン活性化因子(PA)、すなわち *Desmodus rotundus* 吸血コウモリ唾液腺 PA (DSPA α) および *Trimeresurus stejnegeri* ヘビ毒由来 PA (TSV-PA) のプロテアーゼドメインの三次元構造が決定され、その構造比較から tPA の特異性の構造的裏付けとなるデータが得られている。DSPA α は F-G-K1-P ドメイン (477 残基, tPA と 85% の相同性) から構成されるが、tPA の Arg 275-Ile 276 に対応するアミノ酸配列は DSPA α では His-Ser でありプラスミンにより二本鎖に変換されない。また DSPA α は F ドメインを介したフィブリンによる活性化を受けるが、tPA とは異なりフィブリン非存在下における酵素活性は非常に低い。DSPA α のプロテアーゼドメインは半径約 25 Å の球状構造であり、予測されたように全体的には tPA の P ドメインの構造と非常に類似し、Gln<10>~Phe<21> から構成される activation loop 近傍ならびに Ile<16> ポケット領域において構造の差が認められているのみである¹⁵⁾。DSPA α においても Lys<156> が存在し、Phe <21>, His <144> も保存されており、これ

が一本鎖型における活性構造を安定化していることも tPA と同様であると解釈されている (図 6c)。tPA の S1~S3/4 サイトを構成しているアミノ酸を比較すると Leu<217>Val, Arg<174>Lys という変化がある以外ほかの 6 残基の同一性は保存され、zymogen triad に対応するアミノ酸残基も tPA と同一である。しかしながらフィブリン非存在下における DSPA α の活性は tPA よりかなり低く、Lys<156>の存在のみでこの活性の差を十分に説明し得るものではないようである。上記 activation loop 近傍ならびに Ile<16>ポケットにおける構造の差、フィンガードメインとの相互作用の強弱が両者間の活性の違いを反映しているのではないかと推定されている。

TSV-PA (234 アミノ酸, 分子量約 33 kDa の糖タンパク質) は batroxobin (BTX), Protein C activator (PCA) のようなヘビ毒由来の酵素とそれぞれ 64%, 66% の高いアミノ酸配列相同性を有するセリンプロテアーゼであるが, BTX, PCA の基質であるフィブリノゲンあるいはプロテイン C を分解することもなければ活性化することもない。tPA の P ドメインとはアミノ酸配列の相同性が 23% であり, プラスミノゲン活性化能は tPA の約 1/50 であるが, 非常に特異的にプラスミノゲンを活性化することが知られている。F, EGF, K ドメインは存在せずしたがってフィブリンによる活性化も受けない。また高分子インヒビターによる阻害を受けないという特徴が認められている。TSV-PA は半径約 25 Å の球状構造であり, 典型的なトリプシン様のポリペプチド鎖の折り畳み構造である。3次元構造上におけるアミノ酸配列の相同性を比較した場合, tPA および glandular kallikrein と類似性が高い。活性中心を構成するアミノ酸残基の配向性も tPA とほぼ同様である (図 6d)。このほか tPA, uPA および TSV-PA では共通して保存されている Asp 82 <97> は, これを Val に変異した TSV-PA ではプラスミノゲン活性化能が低下し, 基質認識に重要な残

基であることが明らかになっていたが¹⁸⁾, TSV-PA の構造から Asp <97> の側鎖は Arg 157 <174> と塩結合を形成し S4 サイトの一部を構成し得ることが明らかにされている。一方, 構造上の差異では Phe 178 <193> (tPA では Gly 476) の存在がユニークであり, これにより TSV-PA の高い基質特異性, 高分子阻害剤に対する抵抗性 (安定な複合体を形成しない) が保持されていると解釈されている。またカルボキシル末端に架かる第 6 番目の SS 結合 (Cys 74 <91> -Cys 232 <245 e>) が存在する点もユニークであるが, 特異性に対して大きな影響を及ぼしていないようである¹⁷⁾。

4. まとめ

tPA 各ドメインの立体構造決定により, 同酵素の有する特異的機能が 3次元データをもとにかなり詳細に説明することが出来るようになった。現在の構造データでは, 例えば tPA の全ドメインの関与するフィブリン・プラスミノゲン・tPA 相互作用を説明するには未だ不十分であり, 今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Keyte BA, Paoni NF, Bennett WF: Site-Directed Mutagenesis of Tissue-Type Plasminogen Activator, in Cleland JL, Craik CS (eds): Protein Engineering: Principles and Practice, New York, Wiley-Liss, 1996, 435-466.
- 2) Downing AK, Driscoll PC, Harvey TS, Dudgeon TJ, Smith BO, Baron M, Campbell ID: Solution structure of the fibrin binding finger domain of tissue-type plasminogen activator determined by ¹H Nuclear Magnetic Resonance. J Mol Biol 225: 821-833, 1992.
- 3) Smith BO, Downing AK, Driscoll PC, Dudgeon TJ, Campbell ID: The solution structure and backbone dynamics of the fibronectin type I and epidermal growth factor-like pair of modules of tissue-type plasminogen activator. Structure 3:

- 823-833, 1995.
- 4) de Vos AM, Ultsch MH, Kelly RF, Padmanabhan K, Tulinsky A, Westbrook ML, Kossiakoff AA: crystal structure of the kringle 2 domain of tissue plasminogen activator at 2.4Å resolution. *Biochemistry* **31**: 270-279, 1992.
 - 5) Byeon In-Ja L, Llinas, M: Solution structure of the tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain complexed to 6-aminohexanoic acid an antifibrinolytic drug. *J Mol Biol* **222**: 1035-1051, 1991.
 - 6) Byeon In-Ja L, Kelly RF, Mulkerrin MG, Seong SA An, Llinas M: Ligand binding to the tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain: structural characterization by ¹H-NMR. *Biochemistry* **34**: 2739-2750, 1995.
 - 7) Hansen AP, Petros AM, Meadows RP, Nettesheim DG, Mazar AP, Olejniczak ET, Xu RX, Pederson TM, Henkin J, Fesik SW: Solution structure of the amino-terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator. *Biochemistry* **33**: 4847-4864, 1994.
 - 8) Renatus M, Engh RA, Stubbs MT, Huber R, Fischer S, Kohnert U, Bode W: Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO J.* **16**: 4797-4805, 1997.
 - 9) Hu C-K, Kohnert U, Sturzenbecher J, Fischer S, Llinas M: Complexation of the tissue plasminogen activator protease with benzamide-type inhibitors: Interference by the kringle 2 module. *Biochemistry* **35**: 3270-3276, 1996.
 - 10) Lamba D, Bauer M, Huber R, Fischer S, Rudolph R, Kohnert U, Bode W: The 2.3Å crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator. *J Mol Biol* **258**: 117-135, 1996.
 - 11) Madison EL, Kobe L, Gething M-J, Sambrook JF, Goldsmith EJ: Converting Tissue Plasminogen to a zymogen: A regulatory triad of Asp-His-Ser. *Science* **262**: 419-421, 1993.
 - 12) Tachias K, Madison EL: Converting Tissue-type plasminogen activator into a zymogen. *J Biol Chem* **271**: 28749-28752, 1996.
 - 13) Tachias K, Madison EL: Converting tissue type plasminogen activator into a zymogen. Important Role of Lys¹⁵⁶. *J. Biol. Chem.* **272**: 28-31, 1997.
 - 14) Renatus M, Bode W, Huber W, Sturzebecher J, Prasa D, Fischer S, Kohnert U, Stubbs MT: Structural mapping of the active site specificity determinants of human tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* **272**: 21713-21719, 1997.
 - 15) Renatus M, Stubbs MT, Huber R, Bringmann P, Donner P, Schleuning W-D, Bode W: Catalytic domain structure of vampire bat plasminogen activator: A molecular paradigm for proteolysis without activation cleavage. *Biochemistry* **36**: 13483-13493, 1997.
 - 16) Parry MAA, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W: The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure* **6**: 1195-1206, 1998.
 - 17) Tachias K, Madison EL: Variants of tissue-type plasminogen activator that display extraordinary resistance to inhibition by the serpin plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem* **272**: 14580-14585, 1997.
 - 18) Zhang Y, Wisner A, Maroun RC, Choumet V, Xiong Y, Cassian B: *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. *J Biol Chem* **272**: 20531-20537, 1997.