

Alkaline phosphatase의 기질 특이성

이경태[#] · 권창호 · E. Waelkens* · W. Merlevede*

경희대학교 약학대학, *벨지움 루벵 의과대학

(Received September 9, 1993)

Substrate Specificity of Alkaline Phosphatase

Kyung-Tae Lee[#], Chang-Ho Kwon, E. Waelkens*, W. Merlevede*

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

**Afdeling Biochemie, Faculteit Geneeskunde, Campus Gasthuisberg,

Katholieke Universiteit Leuven, B-3000, Belgium

Abstract—The substrate specificity of the purified rabbit plasma alkaline phosphatase (ALPase) was determined towards a extended range of potential substrates including relatively simple phosphate derivatives as *p*-NPP and indolyl phosphate, and several synthetic peptides and phosphoproteins. These results further establish the broad substrate specificity of these circulating enzymes. Interestingly, the plasma ALPase preferentially dephosphorylates Thr over Ser residues, as demonstrated with a series of synthetic peptides. The latter result is in contradiction to the behaviour of the tissue ALPase, which is thought to be the ultimate source of plasma ALPase, and open therefore new perspectives with respect to the origin and "solubilisation" processes of these enzymes. Dephosphorylation of protein substrates by endogenous and isolated plasma ALPases indicates that ALPase probably displays protein phosphatase activity *in vivo*.

Keyword □ Alkaline phosphatase, Phosphotyrosine Phosphatase, substrate specificity, *p*-NPP.

Alkaline phosphatase (ALPase)는 자연계에 널리 분포하는 효소로서, 최적 염기성 pH에서 *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP)와 같은 간단한 합성 화합물 등에 작용하는 것으로 아직 정확한 생물학적 기능은 밝혀진 바 없다.¹⁾ ALPase는 세균, 배양 암세포 또는 포유류 등 여러 종류의 생물체 조직에서 분리되어 효소의 성질 및 cloning등 많은 보고^{2,3)}가 있었다. 일반적인 ALPase는 대부분 Zinc가 효소의 내부에 기본적으로 존재하는 metalloenzyme¹⁾이며, 포유류 세포에서는 ALPase의 carboxy-terminal기가 phosphatidyl inositol을 통해 세포막의 지방층에 연결된 glycoprotein으로 알려져 있다.⁴⁾ 조직에서의 ALPase 연구는 용해과정, 예를 들면 *n*-butanol,⁵⁾ detergent,⁵⁾

phospholipase C⁶⁾ 또는 proteases⁷⁾ 등을 사용하여 세포막에서 효소를 추출, 분리하였다. 세포막에 결합된 원형 상태와 혈청 또는 혈장에서 용해된 상태의 ALPase 차이점에 대해서는 보고가 거의 없다.

효소의 활성 또는 전기영동에 의한 혈액에서 ALPase의 측정은 여러 질병의 진단, 특히 뼈와 간에서의 질병⁸⁾ 또는 여러 암의 진행 과정에 따른 증후⁹⁾로서 오랫동안 사용되어져 왔다.

세포에서 protein tyrosine kinase(PTK)의 비정상적인 활성의 증가는 세포의 증식과 oncogenic transformation을 일으키는 것으로 보고¹⁰⁾되었으며, PTK의 antagonist로서 작용하는 phosphotyrosine phosphatase(PTPase)는 암의 저해 유전자로 예측되어 많은 연구¹¹⁾가 진행되고 있다. 여러 종류의 암에서 서로

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

다른 PTK가 관여하기 때문에 가능한 많은 PTPase를 분리하여 연구, 비교하는 것이 필요하다고 생각 되어진다.

ALPase의 기질로서 사용되는 *p*-NPP는 phosphotyrosine과 화학 구조식의 유사성으로 인하여 ALPase가 PTPase로서의 기능을 가지고 있다는 것을 보고¹²⁾하였다. Swarpt등¹³⁾은 ALPase가 phosphoserine기 보다 phosphotyrosine기에 6배 이상의 선택성이 있으며, phosphoserine-protein 기질에 비해 phosphotyrosyl-protein에 더 빠르게 인산화를 보고 하였으며, Foulkes등¹⁴⁾도 Alkaline phosphatase가 단백질의 tyrosine에 대해 선택성이 있음을 보고 하였다. 저자는 혈장에서 있는 PTPase의 활성이 전부 ALPase의 활성에 기인 한다는 것을 발표¹⁵⁾ 하였다. 이에 저자는 혈장에서 분리한 ALPase를 이용하여 조직에서의 효소와 다른 기질 특이성 및 생체내의 기능에 대한 지견을 얻었기에 보고한다.

시약 및 실험방법

시약—*p*-NPP와 Na_3VO_4 는 Merck(Germany), levamisole과 Tris는 Janssen Chemical(Belgium)에서 2-ethylaminoethanol은 Aldrich(U.S.A)의 Gold label을 사용하였으며, 그 외 사용한 화합물은 모두 특급 시약을 사용하였다.

ALPase의 정제—ALPase는 토끼의 혈장에서 Lee 등¹⁶⁾의 방법에 따라 정제하였다.

ALPase의 활성 측정—ALPase의 활성은 0.5 mM MgCl_2 와 1 M 2-ethylamino-ethanol을 포함한 10 mM *p*-NPP 반응 기질을 pH 10.3에서 10분 동안 반응 시킨 후, 20% TCA와 6 mg/ml BSA 각각 0.1 ml 첨가로서 반응을 종결시켰다.

시료는 10분 동안 4,000 g에서 원심 분리하여, 상등액 300 μl 를 취해 1 M Na_2CO_3 225 μl 를 첨가하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다(1 unit는 1분 동안에 1 nmol의 *p*-nitrophenol이 생성되는 양으로 하였다).

RCM-lysozyme phosphatase 및 poly[glu : tyr(4 : 1)]의 활성 측정—인산화된 1 μM 의 RCM-lysozyme(7 μM) 및 poly[glu : tyr(4 : 1)] (7 μM)에서 유리되는 인산을 정량하는 것으로 Xavier등¹⁷⁾의 방법에 따랐다. (1 unit는 1분 동안에 1 nmol의 [^{32}P]phosphate가 유

리되는 효소의 양을 나타낸다).

Phosphorylase a의 활성 측정—기본적으로 Jessus 등¹⁸⁾의 방법에 따랐으며, 인산화된 phosphorylase a에서 유리되는 인산을 측정하는 것으로 30 μl 의 분석 혼합물 중에 1 mg/ml phosphorylase a와, 20 mM Tris/HCl (pH 7.4), 5 mM caffeine, 0.5 mM dithiothreitol과 1 mg/ml BSA를 포함하고 있다(1 unit는 1분 동안에 1 nmol의 [^{32}P]phosphate가 유리되는 효소의 양을 나타낸다).

ATPase의 활성 측정— ^{32}P 로 labelling된 ATP (ATP의 최종농도는 10 mM로서 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 를 포함한다)에서 유리되는 인산을 측정하였다(1 unit는 1분 동안에 1 nmol의 [^{32}P]phosphate가 유리되는 효소의 양으로 하였다).

전기영동—전기영동은 1% SDS와 Tris-glycine 완충액을 포함한 10% acrylamide gel을 이용하여 Laemmli 법에 따라 행했으며 1~5 g의 단백질을 20 mV에 2시간 동안 전기영동 시켰다. Gel의 염색은 Coomassie Brilliant Blue로 염색 및 autoradiography하였다.

흰쥐 뇌 및 A431 세포막의 인산화 및 탈인산화—흰쥐(Sprague-Dawley CD계, 200~250 g)를 치사시킨 후 즉시 뇌를 1 mM DTT, 1 mM EGTA, 250 mM Sucrose, 0.5 mM PMSF와 1 mM Benzamidine을 함유한, 50 mM Tris 완충액 (4°C, pH 7.4)에 넣었다. Dounce로 homogenization하여 25,000 g에 30분 동안 원심 분리한 후, 상등액을 150 μM 의 [γ - ^{32}P]-ATP [1000 cpm/pmol]을 포함한 완충액에서 20분간 배양하였다. 10% TCA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 혼합물을 5분 동안 25,000 g에서 원심 분리하였다. 침전물을 1 M Tris/HCl pH 7.4의 완충액으로 재용해시킨 다음 위에서 사용한 완충액으로 2번 세척하였다. 용해된 침전물(30 g)을 같은 양으로 나누어 20 mM Tris/HCl pH 7.4 완충액에서 또는 혈장에서 분리한 ALPase(5 units에는 3.5 g의 단백질 함유)와 반응시켰다.

기간별로 반응 혼합액의 시료를 취하여 SDS-PAGE에 넣은 후 autoradiography를 하였다.

A431 세포막의 인산화 및 탈인산화—Thom등¹⁹⁾의 방법에 따라 세포막을 분리 하였다. 준비된 membrane은 EGF 10 ng과 먼저 배양²⁰⁾ 후 50 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM MnCl_2 , 1% NP-40, 1 M Na_3VO_4 ,

150 mM NaCl과 0.3 mM [γ - ^{32}P]-ATP [1000 cpm/pmol]을 30°C 에서 20분간 인산화 시켰다. 내인성 kinase를 저해시키기 위해 20 mM EDTA를 첨가한 후, 혼합물을 5분 동안 20,000 g로 원심 분리하였다. 침전물은 100 mM Tris/HCl pH 7.4 완충액에서 재용해시킨 후 위에서 설명한 방법에 따라 2번 세척하였다. 시료(30 g)를 levamisole (10 mM)을 첨가하는 것을 제외하고는 흰쥐 뇌에서의 실험법에 따랐다.

합성 Peptide의 인산화 및 탈인산화— 합성 peptide의 제조 및 인산화는 Agonist 등²⁰⁾의 방법에 따랐으며, 요약하면 synthetic peptide의 인산화는 200 μM [^{32}P]ATP (300~400 cpm/pmol), 200 mM HEPES (pH 6.5), 100 mM MgCl_2 , 1.2 units cAMP-dependent protein kinase와 0.1 mg/ml 합성 peptide를 최종 양 250 μL 에서 반응시켰다. 2시간 반응 후 [γ - ^{32}P]ATP는 acetic acid를 첨가하여 제거하고 시료를 phosphocellulose에 넣었다. Phosphocellulose에 3 M HCl 3~4 ml을 넣어 peptide를 추출하였다. 탈인산화는 10 μL 의 인산화된 기질을 pH 7.4에서 ALPase(5 units in 3.4 g)와 반응 시켰다. (1 unit는 1분 동안에 1 nmol의 [^{32}P] phosphate가 유리되는 효소의 양을 나타낸다). 반응을 isobutylalcohol-toluene (1 : 1, v/v) 1.2 ml 및 5 mM silicotungstate와 1 mM H_2SO_4 을 함유한 0.8 ml 용액의 첨가에 의해 종결시킨 후, 유리되는 ^{32}P 는 phosphomolybdic 혼합물로 추출한 후 측정하였다.

실험결과 및 고찰

단순한 인산 화합물의 유리된 혈장 ALPase에 의한 탈인산화— 정제된 혈장 ALPase의 기질 특이성을 연구하기 위해 비교적 간단한 인산 유도체 (예를 들면 *p*-NPP, indolyl phosphate, 여러 합성 peptide 등) 및 인산화된 단백질들에 대해 기질을 조사하였다(Table I 및 II).

정제된 혈장 ALPase는 여러 기질중 *p*-NPP, indolyl phosphate, ATP, poly[Glu : Tyr(4 : 1)], peptide(histone f2b의 인산화 장소와 유사한 peptide)와 RCM-lysozyme 등의 탈인산화를 볼 수 있었으며, 일부의 기질, 예를 들면 histone f2b(cAMP-dependent protein kinase에 의해 인산화됨)와 casein (casein kinase-2에 의해 인산화됨) 등은 탈인산화가 거의 되

Table I—Tested substrate of the plasma ALPase

1. Synthetic substrates.
a) Low mol. wt substrates.
<i>p</i> NPP
ATP
Indolyl phosphate
b) Synthetic peptides
poly[Glu : Tyr(^{32}p)(4 : 1)]
A1, A2, A3, S2, S3, S4, T4 (see table II)
2. Proteins.
[histone VII-s (subgroup f2b)]
[casein]
membrane proteins (A431 cells)
soluble rat brain extracts
RCM-lysozyme

Table II—Dephosphorylation of representative phosphopeptides by isolated plasma ALPase(5 units in 3.5 μg protein)

Phosphopeptide	mU/ml
Arg-Arg-Ala-Thr(P)-Val-Ala	(T4) 12
Arg-Arg-Ala-Ser(P)-Val-Ala	(S2) 17
Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Ser(P)-Val-Ala	(A1) 18.5
Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Ala-Ser(P)-Val-Ala	(A2) 34.5
Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Ala-Ala-Ser(P)-Val-Val	(A3) 43.3
Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Ser(P)-Val-Val	(S3) -
Arg-Arg-Arg-Glu-Glu-Glu-Thr(P)-Val-Val	(S4) 268.4

지않았다. 또한 phosphorylase a를 기질로 사용한 경우에는 인산화를 전혀 볼 수 없었다.

세균 또는 표유류에서 분리한 ALPase 등은 Ser기를 탈인산화시키는 protein phosphatase로서 보고¹⁾되었다. 본 실험에서는 Ser기에 인산화한 histone f2b 또는 Phosphorylase a등은 유리 혈장 ALPase에 의해 탈인산화가 거의 없어, 혈장 ALPase는 조직에서 유리한 ALPase들과 기질에 대해 상당한 차이를 나타냈다. 이러한 실험 결과는 조직에서 ALPase를 추출시키기 위한 인위적인 방법들이 효소 구조에 영향을 미쳐 자연적으로 유리된 혈장내의 ALPase와 다른 기질 특이성을 나타내는 것으로 추측된다.

합성 Peptide의 탈인산화— Table II는 혈장에서 분리한 일정한 양의 ALPase (5 units)를 사용하여 Ser과 Thr기를 인산화한 연속되는 peptide를 반응한

결과이다. 인산화한 Ser기 주위에 Arg과 Ala기의 증가는 Ser기의 탈인산화를 조금씩 증가시켰으며, Ser기 주위의 Ala기의 증가 또는 Ala대신 Val기의 치환으로 탈인산화가 증가됨을 알 수 있었다. 또한 같은 구조의 peptide에서 인산화된 Ser과 Thr기가 치환된 경우, 유리된 혈장 ALPase는 Ser기보다 Thr기에 상대적으로 탈인산화의 선택성이 있는 것으로 나타났다.

본 실험에서 amino acid을 변화시킨 peptide를 기질로 사용한 실험 결과에서 ALPase의 기질에 대한 탈인산화의 차이는 효소에 의한 것이 아니라 기질의 변화에 따라 변하는 것임을 알 수 있었다.

여러 기질에 대한 분리 혈장 ALPase의 최적 pH
-분리된 혈장 ALPase를 사용하여 단백질 기질 및 합성한 여러 기질의 최적 pH를 측정하였다.

RCM-lysozyme을 이용한 ALPase의 최적 pH는 생리적 pH인 7~8 사이에 있었으며, poly[glu : tyr(4 : 1)], ATP 그리고 p-NPP 등의 단순한 합성 화합물의 최적 pH는 각각 9, 8, 10 등으로 염기성을 보여 주었다 (Fig. 1).

여러 기질에 대한 ALPase의 활성이 다른 효소에 의한 가능성을 제거하기 위해, 기질의 탈인산화 반응에 tissue unspecific ALPase를 선택적으로 저해하는 EDTA (1 mM), levamisole(1 mM) 과 DTT(1 mM) 등을 반응 혼합물에 첨가하여 각각의 최적 pH에서 효소활성을 측정한 결과 모든 활성은 이러한 분자들에 의해 저해되었으며(Table III), PTPase(RCM-lysozyme을 기질로 사용)와 ALPase(p-NPP를 기질로 사용)의 활성은 분리 과정의 마지막 단계까지 완벽하게 겹쳐짐으로서 한 효소에 의한 것으로 사려되었다. 이상의 결과에서 PTPase와 ATPase의 활성은 다른 효소에 의한 것이 아닌 하나의 효소인 ALPase에 있음을 뒷바침 해주고 있다.

Table III—Inhibition of phosphoprotein and phosphohydrolytic activity of the plasma ALPase (5 units in 3.5 ug protein) by DTA, levamisol and DTT

substrate	% inhibition induced by various effectors		
	EDTA(1 mM)	Levamisol(1 mM)	DTT(1 mM)
RCM-Lysozyme	100 %	50 %	50 %
ATP	50 %	100 %	100 %
pNPP	100 %	90 %	89 %

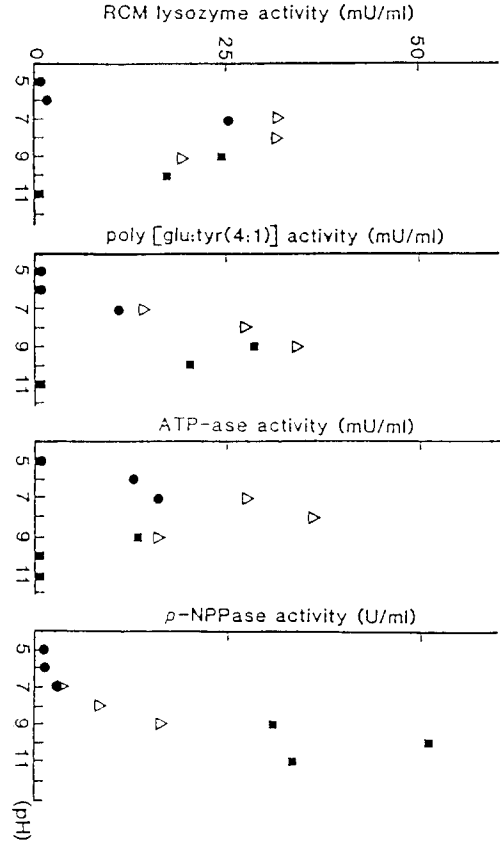


Fig. 1—pH optima of isolated ALPase activity obtained with different substrates. The different pH buffers were: 0-0 Mes (pH 5~7) 50 mM. Δ-Δ Tris (pH 7~9) 50 mM. x-x NaHCO₃ (pH 9~11) 50 mM.

이러한 실험 결과에서 ALPase가 단순한 합성 화합물에서 보여지는 염기성 최적 pH는 ALPase 효소 자체의 내부 성질에 의한 것이 아닌, 기질에 따라 변화됨을 알 수 있다. 더욱이 생체내 기질에 가까운 단백질인 RCM-lysozyme의 최적 pH가 다른 단순한 화합물에 비해 중성에 가까운 것은, 혈장에서 분리한 ALPase는 *in vivo*에서 protein phosphatase로서 특히 PTPase의 기능을 제시하여 준다.

Phosphoprotein의 정제 ALPase에 의한 탈인산화
—A431 human epidermoid carcinoma cells의 세포막을 분리한 후, EGF와 [γ-³²P]ATP를 넣어 함께 배양한 결과 EGF는 수용체(170 KDa)에 결합하여 수용체의 Tyr기 및 세포내 여러 단백질의 인산화를 시

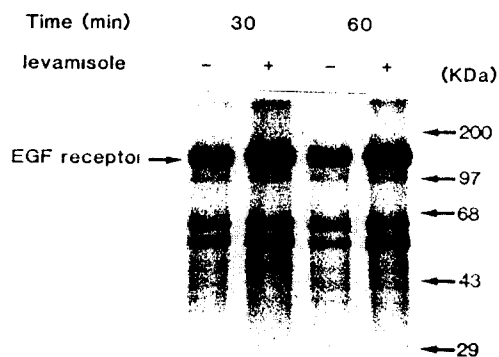


Fig. 2—Time course of dephosphorylation of ^{32}P -labelled EGF receptor by endogenous ALPase.

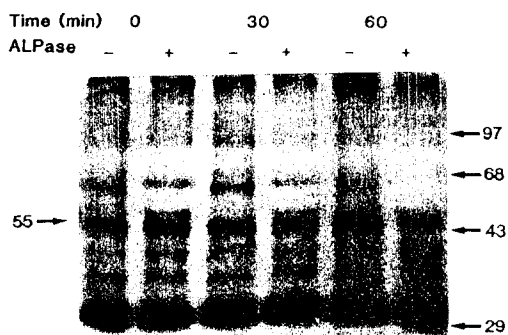


Fig. 3—Time course of the dephosphorylation of ^{32}P -labelled rat brain extracts by isolated soluble ALPase from plasma.

켰다. EGF수용체의 Tyrosine기의 최대 인산화는 30분 후에 보였으며, 인산화된 EGF receptor는 PVDF membrane에 blotting한 후, p-Tyr antibody의 immunoprecipitation에 의해 Tyrosine기의 인산화를 확인하였다.

Tyr기에 인산화된 EGF receptor를 ALPase에 특이하게 저해하는 levamisole을 첨가하여 대조군과 비교한 결과 levamisole에 특이하게 저해되는 내인성 ALPase에 의해 EGF receptor의 탈인산화가 반응시간에 따라 감소하였으며, 60분 후에는 약 50%가 대조군에 비하여 감소를 보였다(Fig. 2).

가용성 흰쥐뇌의 추출물중 어떠한 단백질이 ALPase의 가능한 단백질 기질임을 검사하기 위해 흰쥐

의 가용성 추출물에 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 의 첨가 후 내인성 kinase에 의해 여러 단백질을 인산화 시켰다. 그 중에서 55과 64 KDa의 단백질이 일정한 양의 분리 혈장 ALPase와(5 units) 반응 시켰을 때, 반응시간에 따라 탈인산화가 증가됨으로써 정제된 ALPase의 가능한 단백질 기질임을 보였다(Fig. 3).

이러한 결과들은 정제된 ALPase 또는 endogenous ALPase가 생리적인 기질 단백질을 이용해서 탈인산화를 함으로서 *in vivo*에서 protein phosphatase의 활성을 가지고 있음을 확인하게 하는 것으로, 특히 EGF 수용체 및 RCM-lysozyme의 탈인산화에서 ALPase는 *in vivo*에서 PTPase로서 작용할 것임을 뒷바침하고 있다.

결론

분리 혈장 및 endogenous ALPase를 이용하여 여러 기질을 사용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. (1) 혈장에서 유리한 ALPase는 세균 및 조직에서 분리한 ALPases와는 다른 기질 특이성을 가지고 있었다. (2) 여러 합성 화합물 및 단순한 합성 화합물을 사용하여 유리 혈장 ALPase의 탈인산화를 조사한 결과 ALPase의 최적 pH는 알칼리성으로 기질에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. (3) *In vivo*에서의 ALPase의 생리적 기능은 protein phosphatase로서, 특히 PTPase로서의 가능성을 보여 주었다.

문헌

- 1) McComb, R.B., Bowers, G.N. and Posen, S.: Alkaline Phosphatase, Plenum Press, New York (1979).
- 2) Millan, J.L.: Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 3112 (1986).
- 3) Weiss, M.J., Henthron, P.S., Lafferty, M.A., Slaughter, C., Raducha, M. and Harris, H.: Isolation and Characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 7182 (1986).
- 4) Low, M.G., Ferguson, M.A.J., Feuterman, A.H. and Silman, I.: Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins.

- Trends Biochem. Sci.*, **11**, 212 (1986).
- 5) Chacrabarty, A. and Stinson, R.A.: Properties of membrane-bound and solubilized forms of alkaline phosphatase from human liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **839**, 174 (1985).
 - 6) Low, M.G. and Finean, J.B.: Release of alkaline phosphatase from membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.*, **167**, 281 (1977).
 - 7) Chacrabarty, A. and Stinson, R.A.: The solubilization of tetrameric alkaline phosphatase from human liver and its conversion in to various forms by phosphatidylinositol-specific phospholipase C or proteolysis. *J. Biol. Chem.* **263**, 14368 (1988).
 - 8) Moss, D. W.: Alkaline Phosphatase isoenzymes. *Clin. Chem.*, **28**, 2007 (1982).
 - 9) Moss, D.W.: Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isozymes. *Clic. Biochem.*, **20**, 225 (1987).
 - 10) Sefton, B. M., Huner, T., Beemon, K. and Eckhart, W.: Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous sarcoma virus. *Cell* **20**, 807 (1980).
 - 11) Stinson, R.A. and Chan, J.R.A.: Alkaline phosphatase and its function as a protein phosphatases. *Adv. Prot. Phosphatases* **4**, 127 (1985).
 - 12) Lau, K.W.H., Farley, J.R. and Baylink, D.J.: Phosphotyrosyl protein phosphatases. *Biochem. J.* **257**, 23 (1989).
 - 13) Swarp, G., Cohen, S. and Garbers, D.L.: Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* **256**, 8197 (1981).
 - 14) Foulkes, J.G., Erickson, E. and Erickson, R.L.: Separation of multiple phosphotyrosyl-and phosphoserine-protein phosphatases from chicken brain. *J. Biol. Chem.* **258**, 431 (1983).
 - 15) Lee, K.T., Waelkens, E. and Merlevede, W.: Plasma tyrosine phosphatase from healthy rabbit can be totally ascribed to the tissue-unspecific alkaline phosphatase. *Arch. Int. Pharmacodyn. pharmacother.*, **311**, 18 (1991).
 - 16) Lee, K.T., Waelkens, E. and Merlevede, W.: Purification of alkaline phosphatase from the rabbit serum. *Clin. Chem. Res. Commun.* **3**, 151 (1990).
 - 17) Cayla, X., Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W.: Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activating factor from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* **29**, 658 (1990).
 - 18) Jesus, C., Goris, J., Cayla, X., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W.: Tubulin and MAP2 regulate the PCS phosphatase activity: a possible new role for microtubular proteins. *Eur. J. Biochem.* **180**, 15 (1989).
 - 19) Thom, D., Powell, A.J., Lloyd, C.W. and Rees, D.A.: Rapid isolation of plasma membranes in high yield from cultured fibroblast. *Biochem. J.* **168**, 187 (1977).
 - 20) Agostinis, P., Goris, J., Waelkens, E., Pinna, L.A., Marchiori, F. and Merlevede, W.: Dephosphorylation of phosphoproteins and synthetic phosphopeptides. *J. Biol. Chem.* **262**, 1060 (1987).