原 著

肝コリンエステラーゼの互換性について

和 田 薫 赤 井 三 千 男

九州大学歯学部 第2口腔解剖学教室*

〔受付: 昭和50年4月8日〕

抄録: 肝コリンエステラーゼについて, イソ酵素の相互変換性をしらべた。マウス肝の均質化したものからもっとも活性が強い硫酸分画をとり, Sephadex G-200 のクロマトグラフィーをおこない, 酵素活性のピークに相当する分画を集め, ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると, アセチルチオコリンヨードを基質としたときは5つ, ブチリルチオコリンヨードを基質としたときは6つの活性バンドがあらわれた。両基質とも1~5のバンドの位置は一致するが, もっとも易動度が大きい6のバンドは後者に特有のものである。

さらに泳動後のゲルを各バンドに相当する位置で切りとり, 均質化し, 各酵素を抽出して, 再泳動すると各バンドの位置に相当して酵素活性があらわれるが, 1, 2, 4のバンドでは3の位置に, 5のバンドでは3と4の位置にそれぞれ弱い活性のバンドを派生し, 3と6のバンドからは他のバンドを派生しない。このことからマウス肝コリンエステラーゼのイソ酵素間には交換性があるものと推論した。

イソ酵素 (isozyme または isoenzyme) は Markert ら¹⁾の命名によるものであるが, 彼らはこの名称は高度の特異性をもつ乳酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素およびイソクエン酸脱水素酵素に限るべきで, 特異性が重なり合っている酵素には用いるべきでないとしている²⁾。しかし, その後, この用語は広い意味で用いられるようになり, 人によって多少定義の表現は異なるが, 同一組織または細胞において同じ化学反応を触媒する一部の物理化学的性質 (分子構造も含まれる) が異なっている多形酵素に対し, この名称が用いられているようである^{3,4,5,6)}。コリンエステラーゼ (EC 3. 1. 1. 7 と EC 3. 1. 1. 8: ChE) にもイソ酵素があるとされているが, その分子構造が明らかになるにつれて, この酵素の間で aggregation や conversion がおこり, さらにこれらのうちで互に変換するものもあることがわかってきた。すなわち試料の濃縮⁷⁾, 尿素処理^{8,9)}, pH やイオン強度の変化¹⁰⁾, Trypsin などの蛋白溶解

酵素の作用^{11,12,13)}などにより, 特定のバンドが消失したり, 1つのバンドが, 2つ以上に分かれたりすることが報告されている。

本研究では肝 ChE の精製過程において, 各バンドのイソ酵素が相互交換するものか, また交換するとすればどのバンドにおこりやすいかを検討したので報告する。

材料と方法

肝 ChE 試料の調製 DDD 系成熟マウス (雄) の肝をエーテル麻酔下でとり出し, Guilbault 法¹⁴⁾を参考にして酵素の調製をした。すなわち, 肝をその20倍量の4%ブタノールと0.4% Taurocholate を含む蒸留水の中で, テフロンホモジナイザーで均質化し, さらにそれを一晩攪拌したのち, 濾紙 (東洋濾紙 No. 2) を敷いたガラスフィルターで濾過, 濾液を6000g, 30分間遠沈, その上清を濾過して, 20倍量の $1/15$ M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で一晩透析した。つぎにこの透析した

Interconvertibility of liver cholinesterases.

Kaoru WADA and Michio AKAI (Department of Oral Anatomy, Faculty of Dentistry Kyushu University, Fukuoka)

* 福岡市東区馬出3丁目1の1 (〒812)

Jap. J. oral Biol., 17: 201-208, 1975.

液を 6000 g, 30 分間遠沈して得た上清を濾過し, これを 20, 40, 60, 80, 100 % 硫酸に入れ, 終濃度をそれぞれ 14, 28, 42, 57, 71 % とし, 1 時間攪拌した。これらを遠沈して得られた沈澱物を少量の $1/15$ M リン酸緩衝液に溶かし, 20 倍量の蒸留水で一晩透析したものの酵素活性を電気泳動像と分光光度計によって検討した。各分画のうち, 酵素活性がもっともつよく, 活性バンドの数も多い分画 (57 % 分画) を 6000g, 30 分間遠沈, その上清を Sephadex G-200 カラム (1.5×90cm) にかけて, $1/15$ M リン酸緩衝液で溶出した。この溶出物の 280m μ の紫外線吸収度と ChE 活性度 (Cholinesterase Test Wako 一和光純薬製を用い, 420 m μ の波長で測定) を測り, 酵素活性のある分画を集め, コロジオンバックで $1/30$ に濃縮し, 試料とした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Davis 法¹⁶⁾により 7 % ポリアクリルアミドゲルを支持体として, トリスグリシン緩衝液 (pH 8.3) で 2.5mA/gel の通電により, 4°C, 90~100 分間 (BPB を指標とする) 泳動した。泳動後ゲルをガラス管からとり出し, 1 % 塩化カルシウム 10 % ホルマリン液で 4°C, 60 分間固定, 一晩水洗したのち, Karnovsky-Roots 法¹⁵⁾によりアセチルチオコリンヨード (AcTh) およびブチリルチオコリンヨード (BuTh) を基質にして 37°C, 6 時間浸漬し, 酵素活性の検出をおこなった。

阻害実験は 10^{-5} M 硫酸エゼリン, iso-OMPA (tetra-iso-propylpyrophosphoramidate) および DFP (di-isopropylfluorophosphate) を用いた。

各イソ酵素の分離と調製 上記 ChE 試料の調製法によってつくった試料を同時に 12 本のポリアクリルアミドゲルカラムに入れ, 上記の方法で電気泳動し, そのうち 2 本は塩化カルシウムホルマリンで固定, 水洗し, AcTh と BuTh を基質とした Karnovsky-Roots 法¹⁵⁾で酵素活性を検出し, この 2 本について, それぞれのバンドの原点からの距離とバンドの幅を測定し, 残りの 10 本を凍結して, それぞれのバンドの位置と幅でカミソリの刃によりゲルを切りとった。ゲル切片はそれぞれの 10 倍量の 40 % 蔗糖液に入れ, ホモジナイザーで均質化し, 6000 g, 30 分間遠沈して得た上清をコ

図1 泳動ゲルからの各イソ酵素の単離, 抽出法の模式図

ロジオンバックで $1/10$ に濃縮し, 上記ポリアクリルアミドゲル泳動法によって電気泳動した (図1)。

実験結果

各硫酸分画における ChE 活性 (図2) 最終濃度 14, 28, 42, 57, 71 % の硫酸分画をポリアクリ

図2 各硫酸分画の ChE 泳動パターン
基質: AcTh

ルアミドゲル電気泳動し, AcTh を基質にして酵素活性を検出すると, 57 % 硫酸分画の ChE 活性がもっともつよく, バンドの数も多い。また, Cholinesterase Test Wako を用いて 420m μ の吸

表 1 各硫酸分画の ChE 活性値

Fraction	Activity (μ moles/ml/h)
14%	0
28"	1.9
42"	6.4
57"	46.4
71"	14.4

図3 57%硫安分画の Sephadex G-200カラムクロマトグラム

光度測定により 各硫安分画の酵素活性値を調べると、表 1 に示すように 57 % 分画がもっともつよく、電気泳動像の結果に一致している。

57 %硫安分画のクロマトグラフィー (図 3)

もっとも酵素活性のつよい57%硫安分画を Sephadex G-200 にかけて各溶出分画の280mμ 紫外線吸収度と酵素活性値を測ると紫外線吸収度は 13, 25, 30, 46, 55 本目にそれぞれピークがあり、酵素活性のピークは 20~28 本目の間に 1 つみられる。

Sephadex G-200 溶出分画の電気泳動像 (図 4)

図5 各バンドの再電気泳動パターン
アミドブラック染色 T: 対象, 右7つはバンドの模式図

図4 Sephadex カラム溶出分画の電気泳動パターン
I : アミドブラック染色, II : 基質 AcTh,
III : 基質 BuTh 右側は各バンドの模式図

Sephadex G-200カラムで酵素活性のある分画を一つに集めて電気泳動し、ゲルをアミドブラック染色すると蛋白バンドが9つあらわれるが、ChE 活性バンドに一致する 1~6 以外に、3 と 4 の間に 2 つ、6 よりも易動度が大きいバンドが 1 つあらわれた。これらは ChE と同じ分画部分に含まれる ChE でない蛋白分子である。

ChE 活性バンドを原点から陽極に向い順に 1, 2, 3, 4, 5, 6 と名付けると、AcTh を基質にすると 1~5 があらわれ、6 はあらわれないが、BuTh を基質にすると 1~6 のバンドがあらわれる。したがって 6 のバンドは BuTh を基質にしたときのみあらわれるものである。

図6 各イソ酵素の再電気泳動パターン 基質 AcTh

図7 各イソ酵素の再電気泳動パターン 基質 BuTh

各バンドの再電気泳動像 上記6つの各バンドに相当する部分から抽出した酵素試料を再泳動して、アミドブラック染色すると、それぞれのバンドに一致するところに蛋白バンドがあらわれ、各バンドは重なり合わず、よく分離されていることがわかる(図5)。つぎに各バンドの AcTh を基質にしたときの活性をみると(図6)、アミドブラック染色で示された蛋白バンドの位置にそれぞれ強い活性があり、そのほかに、1, 2, 4, 5では3の位置に弱い活性を示すバンドがあらわれ、さらに5では3以外に4の位置にも弱い活性を示すバンドがある。3はもっとも強い活性を示すが、ほかの位置には活性があらわれない。BuTh を基質にしたときは(図7)、AcTh を基質にしたときと同じ活性バンドを示すが、この基質に特有な6の位置にバンドがあらわれる。そして、これは3と同様、ほか

図8 各イソ酵素に対する各種阻害剤の効果
C: 対象, E: エゼリン, D: DFP,
O: iso-OMPA ($10^{-5}M$)

のバンドを派生しない。

各バンドに対する阻害剤の影響 (図8) AcTh

を基質にしたときは、各バンドともに 10^{-5} M エゼリン, DFP によって完全に活性が消失するが、 10^{-5} M iso-OMPA に対しては4のバンドのみに活性が残る。BuTh を基質にしたときも各バンドはエゼリン, DFP で完全に活性を失うが、iso-OMPA では6のバンドだけに活性が残る。

考 察

Bernson ら¹⁷⁾はヒト脳 ChE を澱粉ゲル電気泳動して、いくつかの基質と阻害剤に対する反応度および pH との関係から4つのイソ酵素を分離しているが、これらは一つの酵素がほかの蛋白成分と結合して生じるのであろうとし、その後これらは一つの基本的構造をもつサブユニットが互いに集って多分子型をつくるのであろうと想像した。Lawler²⁸⁾も同じサブユニットの凝集によってつくられるという説を出したが、その構造は乳酸脱水素酵素のような単純なものでないことと、酵素自体の基質特異性が幅広いこと、また純粋な形でとり出すことがむづかしいことなどのため、はっきりしたことはわからなかった。そのうち Kremzner ら¹⁸⁾が電気ウナギの電気器官からかなり純粋な形で ChE をとり出すことに成功し、これらは4つのサブユニットからなることが示され、Reiner ら¹⁹⁾および Zeck ら²⁹⁾も血清 ChE の多分子型がサブユニットの凝集によってできている。そのうち、この凝集現象が試料の処理条件によって変化することがわかり、Grafius ら¹⁰⁾は蔗糖密度勾配遠心法を用いて電気ウナギの ChE は pH やイオン強度の変化により各サブユニットが種々の程度に凝集することを示し、各分子型は凝集の程度がいろんな段階にある産物であるとした。La Motta ら⁷⁾は血清 ChE が5つのイソ酵素に分離されるが、試料を硫酸濃縮すると一つの主成分に転換され、さらにこれらの中に互換性があることを示した。また Main²⁰⁾も ChE のイソ酵素は一つのサブユニットが集積したもので、多分子型の反応速度論的性質はその集積の程度によって変化するものであり、これらのものは相互に転換しうる性質をもつとしている。各バンドの処理条件による相互交換については、Massoulié ら¹²⁾は電気ナマズの電気器官の ChE には A, B,

CとDの4つの成分があって、塩濃度が低いとCとDの間に凝集現象がおこるが、AとBは安定しているとし、La Du ら⁸⁾はヒト血清は易動度の大きい C_4 と小さい C_1, C_2, C_3 の4つの成分に分けられるが、尿素処理すると C_4 が C_3 に変換するとし、Saeed¹¹⁾らはヒト血漿 ChE を易動度の大きいものから順に $E_1 \sim E_5$ と名付けると、トリプシン処理によって E_5 は他のイソ酵素に変換されるとし、Mc Intosh ら⁹⁾もブタ脳 ChE を尿素を含む Triton X-100 で処理すると泳動像が変化し、解離現象がおこることを示唆している。

このように ChE の多分子型は分子の凝集程度の違いにより生じ、また、これらの分子間にはお互いに変換する性質がある。

われわれの実験では Guilbault ら¹⁴⁾が昆虫の ChE を精製するために用いた方法を一部修飾して用いているが、試料作成時には特別の薬剤処理や蛋白分解酵素処理などを加えておらず、ただアクリルアミドゲル切片を機械的にすりつぶした遠心上清を濃縮して電気泳動をくり返しておこなっているだけである。しかし、この操作によって十分に活性をもつ易動度の異なる各イソ酵素を単離することができた。またこれによって3と6以外のバンドには他のバンドに相当するイソ酵素が含まれていることも知った。すなわち、1と2のバンドにはより易動度の大きい3に相当する酵素が含まれ、4と5にはより易動度の小さい3または4に相当する酵素が含まれており、3と6には均一な酵素のみが含まれていることになる。これらの派生した酵素は、電気泳動の条件が同じであることから、1) ゲルを凍結して各バンドに切りとるときに隣りのバンドに相当する部分まで切りとったか、2) 各バンドより抽出した酵素試料が濃縮過程で凝集または分離したのかのいずれかであろう。第一の原因は1, 4, 5のバンドから派生するバンド3がこれらから相当はなれた位置にあらわれていることと、単離抽出した各イソ酵素のバンドの位置と蛋白帯(アミドブラック染色)の位置が一致し、重なり合っていないことなどから否定できる。第二の原因は La Motta ら⁷⁾が指摘するように試料の濃縮によるものかも知れないが、彼らは易動度のもっとも小さな一つの成分に転換される

とし、われわれのように一つのイソ酵素が易動度の大きいものや小さなものを派生したものと異なる。本研究ではもっとも活性の強いバンド3への転換性が示されている。

これらの易動度の異なる多くのイソ酵素が蛋白分子の解離凝集によってできることを分子量の面から示すいくつかの研究がある。Leuzinger ら^{22,23)}は電気ウナギからとった ChE の分子量は 260,000 でその4分の1の分子量をもつ4つのサブユニットからなるという、Mc Intosh ら⁹⁾はブタ脳の ChE の多分子型、IV: III: IIa: II: Ia: I の平均分子量が 1: 2: 3: 4: 6: 7 の関係にあり、IV型の酵素の重合体になっていると推察している。また Massoulie ら¹²⁾は電気ナマズと電気ウナギの電気器官に沈降係数が異なる4つの蛋白集団からなる ChE があり、その一つは蛋白分解過程の間に他の一つへ変換するとしている。Rosenberry ら²⁴⁾は電気ウナギからの 11S ChE は分子量 70,000 のサブユニットからなる4量体であるとしている。

Rieger ら²⁵⁾の電顕的研究によると、電気ウナギの ChE は本来 A, C, D の3つの型があって、これらは4つのサブユニットからなる4量体としての球状型のものが1~3個集まった集合体となって頭部を形成し、それぞれに一つの尾部が結合してできたものであるというサブユニット構造に対するモデルを出した。Dudai ら²⁶⁾も同様に電気ウナギからの沈降係数が異なる3つの ChE の電顕的所見により 11S 型のものは尾部のない4量体構造であり、14S および 18S 型のものは多くのサブユニットからなる頭部と一つの尾部からなるとし、Rieger らと同様の構造を示している。以上のように ChE の蛋白分子はそのサブユニットの会合程度によって種々の分子量をもつ蛋白集団からなり、これがさらに凝集して大きい分子となりうるが、一方大きい分子も種々の条件によって小さな分子に分裂しうる。本研究において、各バンドの中に他のバンドを構成する酵素が含まれていることが示されたのはこのような機構によるものと思われる。

また、各バンドは ChE 阻害剤によって活性が阻害されたが、一部に iso-OMPA によって活性

が阻害されないものがあった。一般に iso-OMPA は AChE よりも BChE に対して抑制力が強いとされているが、バンド6では BuTh を基質にしたときにのみ活性があらわれ、このバンドも iso-OMPA によって阻害されず、また他のバンドも派生しない。

今回の結果は La Motta ら⁷⁾のいう分子間の互換性を示すものもあるが、Chiu ら²¹⁾の互換性を否定するようなバンドもあった。もっとも活性が強い主成分であるのはバンド3であるが、Saeed ら¹¹⁾のいうように“in vivo”ではこのような酵素処理や薬剤処理によって他の酵素を派生することのない主成分を合成する過程での途中産物なのかも知れない。

またバンド6は他のバンドのイソ酵素にくらべて、基質特異性やイソ酵素の互換性がかなりちがっていることから、ChE の性質が特殊なものと思われる。

本研究で用いた泳動法は蛋白分子の大きさばかりでなく、その電荷量による影響も大きいので、この点についてはさらに検討する必要がある。しかしながら、ChE には動物種、器官または組織の違いにより多くのイソ酵素が示されているが、同じ動物の組織器官でもその数が異っているのは、酵素の抽出方法や泳動条件なども含めて実験条件が研究者によってまちまちであるためと、イソ酵素のあらわれ方が、分子量の大きさだけでなく、いろいろな基質や、阻害剤に対する反応度の違い³⁰⁾、あるいは等電点の違いなど酵素蛋白の物理化学的性質の違いがこのような多分子型に反映されることなどを考えると Bernsohn らのいうように ChE のイソ酵素の同定はその多様性のために困難さを増すものと思われる。

結 論

マウス肝の ChE 活性がもっとも強い硫酸分画のクロマトグラフィーをつくり、活性分画を電気泳動するとアセチルチオコリンを基質にしたときは5つ、ブチリルチオコリンを基質にしたときは6つの活性バンドがあらわれた。この各バンドに相当する部分のゲルを切りとり、均質化し、遠沈、上清を濃縮して再び電気泳動すると、各バン

ドの位置に一致して酵素活性があらわれるが、原点から数えて1, 2, 4 番目のバンドは3 の位置に、5 番目のバンドでは3 と4 の位置に弱い活性を示すバンドが派生する。しかし、3 と6 番目のバンドは他のバンドを派生しない。このことから肝ChE のイソ酵素には蛋白分子の凝集または会合により互いに変換しうる性質があると考えられる。

文 献

- 1) MARKERT, C. L. and MØLLER, F.: Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic and species specific pattern. *Proc. nat. Acad. Sci. Wash.*, **45**: 753-763, 1959.
- 2) WILKINSON, J. H.: *Isoenzymes*, 2nd ed, 1-7, 286-292, Chapman & Hall, London, 1970.
- 3) 北村元衛: Isoenzyme, 臨床酵素学 (赤堀四郎編), 初版, 24-30, 朝倉書店, 東京, 1965.
- 4) 中埜栄三, 山本定明: アイソザイム, 蛋白質・核酸・酵素, **11**: 1011-1021, 1966.
- 5) 中島 照: アイソザイムの遺伝学 (井上英二, 柳瀬敏幸編)再版, 228-243, 朝倉書店, 1968.
- 6) SHAW, C. R.: Isoenzymes: Classification, frequency and significance. *Internation. Rev. Cytolog.*, **25**: 293-332, 1969.
- 7) LA MOTTA, R. V., MC COMB, R. B., NOLL, C. R., JR. WETSTONE, H. J. and REINF-RANK, R. F.: Multiple forms of serum cholinesterase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**: 299-305, 1968.
- 8) LA DU, B. N. and DEWALD, B.: Genetic regulation of plasma cholinesterase in man. *Advanc. Enzyme Reg.*, **9**: 312-332, 1971.
- 9) MCINTOSH, C. H. S. and PULMER, D. T.: Multiple forms of acetylcholinesterase from pig brain. *Biochem. J.*, **133**: 655-665, 1973.
- 10) GRAFIUS, M. and MILLAR, D. B.: Reversible aggregation of acetylcholinesterase. II. Interdependence of pH and ionic strength. *Biochemistry*, **6**: 1034-1046, 1967.
- 11) SAEED, S. A., CHARDWICK, G. R. and MILL, P. J.: Action of proteases on human plasma cholinesterase isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **229**: 186-192, 1971.
- 12) MASSOULIÉ, J. et RIEGER, F.: L'acetylcholinestérase des organes électriques de poissons (torpille et gymnote); complexes de membranaires. *Eur. J. Biochem.*, **11**: 441-455, 1969.
- 13) RIEGER, F., TSUZI, S. et MASSOULIÉ, J.: Formes natives et globulaires de l'acetylcholinesterase dans la moelle épinière et le cerveau de gymnote, *Electrophorus electricus*. *Eur. J. Biochem.*, **30**: 73-80, 1972.
- 14) GUILBAULT, G. G., KUANG, S. S. and SADAR, M. H.: Purification and properties of cholinesterases from honeybees-*Apis Mellifera Linnaeus*- and Boll Weevils-*Anthonomus grandis Boheman*. *J. Agr. Food Chem.*, **18**: 692-697, 1970.
- 15) KARNOVSKY, H. J. and ROOTS, L.: A "direct-colouring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 219-221, 1964.
- 16) DAVIS, B.: Disc electrophoresis. II. method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427, 1964.
- 17) BERNSON, J., BARRON, K. D. and HESS, A. R.: Multiple nature of acetylcholinesterase in nerve tissue. *Nature*, **195**: 285-286, 1962.
- 18) KREMER, L. T. and WILSON, I. B.: A partial characterization of acetylcholinesterase. *Biochemistry*, **3**: 1902-1905, 1964.
- 19) REINER, E., SEUFERT, W. and HARDEGG, W.: Occurrence of cholinesterase isoenzymes in horse serum. *Nature*, **205**: 1110-1111, 1965.
- 20) MAIN, A. R.: Kinetic evidence of multiple reversible cholinesterase based on inhibition by organophosphates. *J. Biological Chem.*, **244**: 829-840, 1969.
- 21) CHIU, Y. C., TRIPATHI, R. K. and O'BRIEN, R. D.: Difference in reactivity of four butyrylcholinesterase isozymes towards substrate and inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Communications*, **46**: 35-42, 1972.
- 22) LEUZINGER, W., GOLDBERG, M. and CAUVIN, E.: Molecular properties of acetylcholinesterase. *J. Mol. Biol.*, **40**: 217-225, 1969.
- 23) LEUZINGER, W.: Studies on the subunits of acetylcholinesterase. *Cholinergic Ligand Interactions* (edited by TRIGGLE, D. J., MORAN, J. F. and BARNARD, E. A.), 19-31, Academic Press, New York, 1971.
- 24) ROSENBERY, T. L., CHEN, Y. T. and BOCK, E.: Structure of 11S acetylcholinesterase. Subunit composition. *Biochem.*, **13**: 3068-3079, 1974.
- 25) RIEGER, F., BON, S., MASSOULIÉ, J. et CARTAUD, J.: Observation par microscopie électronique des formes allongées et globulaires de l'acetylcholinestérase de gymnote (*Electrophorus electricus*). *Eur. J. Biochem.*, **34**: 539-547, 1973.
- 26) DUDAI, Y., HERZBERG, M. and SILMAN, I.: Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of electric eel. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**: 2473-2476, 1973.

- 27) BERNSOHN, J., BARRON, K. B., and HESS, A. R.: Cholinesterase in serum as demonstrated by starch gel electrophoresis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **108** : 71-73, 1961.
- 28) LAWLER, H. C.: Purification and properties of an acetylcholinesterase polymer. *J. Biol. Chem.*, **238** : 132-137, 1963.
- 29) ZECK, R. und ENGELHARD, H.: Präparative Trennung und Charakterisierung von 4 Cholinesterasen aus Pferdeserum. *Biochem. Z.*, **343** : 86-96, 1965.
- 30) WENTHOLD, R. J., MAHLER, R. E. and MOORE, W. J.: Properties of acetylcholinesterase from rat brain. *J. Neurochem.*, **22** : 945-949, 1974.