する L-グルタミン酸デヒドラーゼによる L-グルタミン酸の L-ピログルタミン酸への酵素的脱水反応を利用して、ラセミグルタミン酸の分割を試み結果は良好であった。

(2) L-グルタミン酸デヒドラーゼの酵素特異性は全く L-グルタミン酸に限られ、非常に安定な酵素であり、50~100 mg/ml のラセミグルタミン酸溶液を pH 8.0, 50° にて 1 mg/ml の凍結乾燥菌体にて 4 時間処理することにより L-グルタミン酸は完全に L-ピログルタミン酸となり、D-異性体には変化は起らない。

(3) この反応液よりの L-ピログルタミン酸と D-グルタミン酸の分離は強酸性イオン交換樹脂に pH 2.0 で通過せしめることで行える。この流出液より L-ピログルタミン酸、2N アンモニア水溶液溶離液より D-グルタミン酸が得られる。L-グルタミン酸は流出液を濃縮し、加水分解して、D-グルタミン酸は溶離液を濃縮することにより結晶として単離出来る。

(4) 以上の方法でラセミグルタミン酸より L-及び D-グルタミン酸をそれぞれ結晶として分離し得た。この分割法は既知の酵素的なアミノ酸の光学的分割法に比べて操作も簡単で収率も良く、優れた方法であることを認めた。尚この反応とラセミ化反応を組合せてラセミグルタミン酸より L-グルタミン酸への完全な変換については現在検討中である。

(1) 赤堀二郎, 水島三一郎: 蛋白質化学, 1, 427 (1954).	(4) S. Akita, K. Tanka, S. Kinoshita: <i>Biochem. Biophys. Research. Communication</i> , 1, 179 (1959).
(2) M. N. Camieu, L. E. McClure, M. S. Dunn: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 28, 220 (1950).	(5) H. Wilson, R. Cannan: <i>J. Biol. Chem.</i> , 119, 309 (1937).
(3) H. Takahashi, K. Sakaguchi: <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 19, 233 (1955).	

アミノ酸の光学活性に関する酵素的研究 (第 2 報)*

DL-グルタミン酸の酵素的光学活性化

田中正生, 加藤 洋, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 4 月 16 日 受 理

一般にアミノ酸のラセミ分割の工業的意義はラセミ体より L-異性体を分離する事にあり、グルタミン酸のラセミ分割もその用途よりして如何に収率よく L-グルタミン酸をラセミグルタミン酸より回収出来るかがその最大の目的といえる。

先に著者等は *Pseudomonas cruciviae* の生産するグルタミン酸デヒドラーゼによる新しい酵素的分割方法について報告した⁽¹⁾。本報ではこの酵素による L-グルタミン酸の脱水反応と、残存する D-グルタミン酸のラセミ化を同時に連続的に行なわしめて、ラセミグルタミン酸を L-ピログルタミン酸を経て L-グルタミン酸に変換するを試み、比較的良好な結果を得たので、その実験結果について報告する。

Snell 等によればアミノ酸の酵素的ラセミ化はトランスアミナーゼや脱炭酸酵素の場合と同様に、補酵素としての pyridoxal phosphate がアミノ酸と Schiff の塩基を形成し、中間体として錯化合物を作る事により起るとされており^(2,3)、アミノ酸のラセミ化を非酵素的に金属イオンと pyridoxal 或いは芳香族アルデヒドにより触媒せしめたラセマーゼモデル反応についても報告がある^(4,5)。著者等は Schiff の塩基の形成という点よりして、このラセミ化反応はピログルタミン酸の如きアミノ基を有さぬ化合物には起らぬと考え、実験を行った所この事実を確認し得た。又一方 L-グルタミン酸デヒドラーゼの性質を検討した所、ラセマーゼモデル反応の充分に起り得る触媒濃度、反応温度、反応 pH 等の条件下で L-グルタミン酸は酵素的に脱水されて L-ピログルタミン酸となる事を知った。

以上二つの反応をラセミグルタミン酸に同時に起す事で、その総てを L-ピログルタミン酸に変換して、これを

* Enzymatic Studies on the Optical Activity of Amino Acids. Part II. An Optical Activation Method of Racemic Glutamic Acid.

By Masao TANAKA, Yo KATO and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory., Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

加水分解して容易に L-グルタミン酸を得る事が出来るはずで、実験検討の結果、良好な収率で光学活性化を行える事を認めた。

実 験 方 法

(1) 酵素試料 L-グルタミン酸デヒドラーゼは *P. cruciviae* var. *ovalis* B-3 株の凍結乾燥菌体を使用した。その調製は既報⁽¹⁾にて述べた培養条件並びに調製法に従った。

(2) ラセミ化触媒 ラセマーゼモデル反応の触媒として、金属イオンには Cu^{++} イオンを CuCl_2 として使用し、補酵素としてのアルデヒドには *p*-ニトロサルチルアルデヒドを使用した。*p*-ニトロサルチルアルデヒドは Segess 等⁽⁶⁾並びに妻木等⁽⁷⁾の方法により *p*-ニトロトルイジンより酸化により合成した(以後 *p*-ニトロサルチルアルデヒドは PNSA と略記する)。

(3) 定量法 L-グルタミン酸の定量は *E. coli* の L-グルタミン酸脱炭酸酵素によるワールブルグ検圧法によったが、当然予想される如く L-グルタミン酸脱炭酸酵素の活性は PNSA と Cu^{++} イオンの存在により甚しく低下する事を認めたので、次の如き前処理を行い、処理液について検圧法により定量を行った。分析試料は pH 2 以下に調節した後、エーテル抽出を行い PNSA を除去し、この抽出水層を強酸性イオン交換樹脂に吸着せしめ、その 2N 塩酸溶液を減圧濃縮、中和して分析を行った。この前処理により充分満足すべき結果を得る事が出来た。尚 Cu^{++} イオンは PNSA の共存せぬ限り本報告中の実験条件では影響は認められなかった。

L-ピログルタミン酸は分析試料を 2N 塩酸中で 1 時間加水分解し、L-グルタミン酸に変換して、加水分解前後の L-グルタミン酸の差より算出した。但し本報では L-ピログルタミン酸の量は相当する L-グルタミン酸量をもって表示した。

全グルタミン酸は *P. cruciviae* の乾燥菌体よりのグルタミン酸の溶出が殆んど無視し得る事を認めたので、ペーパークロマトグラフにて展開分離後、ニンヒドリン発色にて定量した。ペーパークロマトグラフは *tert*-ブタノール：メタノール：水 (5:4:1) による高温 (60°) 展開⁽⁸⁾を行い、発色は濾紙上で 0.2% ニンヒドリンアセトン溶液にて 60°, 15 分、色素の抽出は 0.04% 硝酸銅含有メタノールにて 40 分を行い、506 m μ の吸光度より標準曲線に従って算出した⁽⁹⁾。

ラセミ化率、或は光学活性化率は加水分解後の L-グルタミン酸量と全グルタミン酸量の比より算出するか、反応液の旋光度で表わした。旋光度は 2N 塩酸中 15° で、ルドルフ光電偏光計 200-80 型にて測定した。

実 験 結 果 及 び 考 察

1) グルタミン酸のラセミ化 グルタミン酸の非酵素的ラセミ化の程度を知るため PNSA と Cu^{++} について種々の条件を検討した。経時的に反応液の旋光度と全グルタミン酸量を測定した結果は、L-グルタミン酸につ

第 1 図 L-グルタミン酸の非酵素的ラセミ化
L-グルタミン酸 400 $\mu\text{M}/\text{ml}$, PNSA 80 $\mu\text{M}/\text{ml}$, Cu^{++} 40 $\mu\text{M}/\text{ml}$, pH 9.0, 0.2 M Na_2CO_3 - Na_2HPO_4 , 温度 75°

○——○ 全グルタミン酸 ●……● $[\alpha]_D$

いては第 1 図に示す如くで、75°, pH 9.0 では 2 時間で完全にラセミ化される。併し、全グルタミン酸量が反応進行と共に減少する。これはグルタミン酸の脱アミノにより起ると考えられるが、この減少は全グルタミン酸の 20% 前後で平衡に達する。

グルタミン酸のラセミ化におけるグルタミン酸、 Cu^{++} イオン、PNSA の反応モル比は第 2 図、第 3 図に示したように 1:0.1:0.1 以上で充分最高の反応率を示す。このモル比は PNSA に限らず、他の芳香族アルデヒドでも同じ結果が得られる。このモル比に関しては後記するように L-グルタミン酸デヒドラーゼの活性と関係があり、単にラセミ化のみの場合は異なりラセミグルタミン酸の活性化の場合は最適モル比が存在し、それ以上のモル比では反応率は急に悪くなる。

更にラセミ化反応についてはその反応速度と温度及び pH の関係について検討した。温度との関係は当然高温ほど反応速度は速くなり $Q_{10} \approx 2$ である。pH に

第2図 PNSA の濃度とラセミ化率

L-グルタミン酸 400 μ M/ml, Cu^{++} 40 μ M/ml, pH 8.0,
0.2 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 温度 60°, 反応時間 1 時間

第3図 Cu^{++} 濃度とラセミ化率

L-グルタミン酸 400 μ M/ml, PNSA 80 μ M/ml, pH 8.0,
0.2 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 温度 60°, 反応時間 1 時間

と考えられる。

2) ピログルタミン酸のラセミ化 ピログルタミン酸はグルタミン酸の場合と異り反応液に Cu^{++} イオン及び PNSA を添加した場合, PNSA が析出し反応液が不均一となるため, グルタミン酸と同一条件では実験する事は出来ない。このためピログルタミン酸とグルタミン酸の混合溶液について反応を行い, そのラセミ化反応に

第5図 グルタミン酸-ピログルタミン酸混合物のラセミ化

全グルタミン酸 $\blacktriangle$ $\blacktriangle$ 加水分解前 $\triangle$ $\triangle$ 加水分解後
旋光度 $\bullet$ $\bullet$ 加水分解前 $\circ$ $\circ$ 加水分解後
L-グルタミン酸 75 μ M/ml, L-ピログルタミン酸 75 μ M/ml, PNSA
30 μ M/ml, Cu^{++} 15 μ M/ml, pH 9.0, 0.2 M Na_2CO_3 - Na_2HPO_4 ,
温度 75°

第4図 ラセミ化と pH

L-グルタミン酸 400 μ M/ml, PNSA 40 μ M/ml, Cu^{++} 40 μ M/ml,
温度 75°, 反応時間 1 時間

pH 2.0~5.0 0.2M クエン酸- Na_2HPO_4
pH 5.0~8.0 0.2M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4
pH 9.0 0.2M Na_2HPO_4 - Na_2CO_3
pH 10.0 0.1M Na_2CO_3 - NaOH
pH 11.0 0.1M Na_2HPO_4 - NaOH

ついては第4図に示すように, 最高反応率を示す pH は 10 以上であるが, pH 3 附近にも極大を示している。この酸性における極大は非酵素的なアミノ基転位の最適 pH であり^(2,3), グルタミン酸の α -炭素の水素原子の解離によるラセミ化ではなく, アミノ基の移動により起る反応の結果

について検討した。グルタミン酸の存在下では反応液は完全に均一透明である。その結果は第5図に示すように, 反応液の旋光度は急速に減少するが, その加水分解液の旋光度は最初基質として含まれるピログルタミン酸に相当するグルタミン酸の旋光度を有し, それ以下にはならない。つまりその構造より推察されたようにピログルタミン酸は PNSA 及び Cu^{++} イオンと錯化合物の形成を行わず, ラセマーゼモデルによるラセミ化が起らぬ事が確認された。この錯化合物形成の難易は水に溶解しにくい PNSA が Cu^{++} 及びグルタミン酸の存在下で容易に溶解するのに対し, ピログルタミン酸の場合には不溶である事からも推察される。

3) L-グルタミン酸の酵素的脱水反応

第 1 表 PNSA, Cu^{++} の L-グルタミン酸デヒドラーゼの活性への影響

乾 燥 菌 体 量 mg/ml	基質触媒量			分 析 値		
	L-グルタ ミン酸 $\mu\text{M}/\text{ml}$	PNSA $\mu\text{M}/\text{ml}$	Cu^{++} $\mu\text{M}/\text{ml}$	L-グルタ ミン酸 加 水 分 解 前 mg/ml	L-グルタ ミン酸 加 水 分 解 後 mg/ml	全グルタ ミン酸加 水分解後 mg/ml
10	350	—	—	2.5	49.8	50.1
10	350	—	35	7.7	51.1	50.2
10	350	70	—	2.0	51.1	49.9
10	350	70	35	4.1	39.9	47.7
10	350	35	35	34.2	41.2	49.4
10	700	70	35	8.4	95.4	98.6

pH 8.0, 0.2M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 温度 50°, 反応時間 1 時間

デヒドラーゼの活性は低下する事なく, L-グルタミン酸は脱水され L-ピログルタミン酸に変換される. 所が前記の如くラセミ化の際のモル比は 1:0.1:0.1 であるが, この条件では L-グルタミン酸デヒドラーゼは明かに阻害が見られた. ただこのモル比は脱水反応の場合は PNSA と Cu^{++} イオンのみの比だけが関係しているようで L-グルタミン酸の量とは無関係に PNSA と Cu^{++} イオンの比が 1:0.5 であれば脱水反応は進行する. 故に光学活性化の場合ラセミ化の対象は D-異性体のみであるとして, グルタミン酸, Cu^{++} イオン, PNSA のモル比を一応 1:0.05:0.1 として基礎的な実験を行う事とした. 尚このモル比に関しては後で考慮する.

4) ラセミグルタミン酸の光学活性化 以上の実験結果より L-グルタミン酸を酵素的に脱水しつつ, 残った D-グルタミン酸をラセミ化して連続的にラセミグルタミン酸を光学的に活性化することは可能であると考えられたので, 予備的に実験を行った所, 明かにラセミグルタミン酸の 75% 以上が L-ピログルタミン酸となる事が認められた. ここに 75% の活性化率はラセミグルタミン酸中の L-グルタミン酸のみが L-ピログルタミン酸になり, 残る D-グルタミン酸がラセミ化して生ずる L-異性体の総量より多いわけで, 連続的に D-グルタミン酸のラセミ化と L-グルタミン酸の脱水反応が起っている事を示すものである.

i) pH: L-グルタミン酸デヒドラーゼの酵素活性の最適 pH は 8.0 であり⁽¹⁰⁾, 又前記の如く非酵素的ラセミ化の最適 pH は 10 以上である. この両者の反応が連続的に起る際の最適値は当然 pH 8.0 附近である事が予想されるが, 実際に各 pH における活性化率を比較した所第 6 図に示すように pH 7.5 に反応の最適 pH のある事が示された. 最適 pH が両反応の最適 pH より低い所にあるのは L-グルタミン酸デヒドラーゼの安定性によるもので, この酵素の活性は pH 8.0 で最も強いが, 安定性はより酸性の方が良い事より, この活性化反応では Cu^{++} イオン及び PNSA の存在によりその傾向が強く表れたものと思われる.

ii) 温度: 反応の最適温度は当然 pH の場合と同

第 6 図 pH と光学活性化

DL-グルタミン酸 400 $\mu\text{M}/\text{ml}$, PNSA 40 $\mu\text{M}/\text{ml}$, Cu^{++} 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$, 乾燥菌体 40mg/ml, 温度 60°, 反応時間 3 時間, 0.2M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 .

第 7 図 温度と光学活性化

DL-グルタミン酸 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$, PNSA 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$, Cu^{++} 5 $\mu\text{M}/\text{ml}$, 乾燥菌体 10mg/ml, pH 7.5, 0.2M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4

○—○ 40° ●—● 50° ⊙—⊙ 60°
△—△ 70° ▲—▲ 80°

L-グルタミン酸デヒドラーゼの活性に対する Cu^{++} イオン及び PNSA の影響を知るため, Cu^{++} イオンと PNSA の存在下で L-グルタミン酸の酵素的脱水反応を行った. この際当然 L-グルタミン酸の非酵素的ラセミ化反応も起るはずで, その影響を出来る限り少くするため反応温度を 50° とし, 1 時間の反応後分析を行った. その結果の一例を示せば第 1 表のようにグルタミン酸, Cu^{++} イオン, PNSA のモル比が 1:0.1:0.2 の場合では L-グルタミン酸

第 8 図 PNSA 濃度と光学活性化

DL-グルタミン酸 100 μ M/ml, Cu^{++} 5 μ M/ml, 乾燥菌体 10 mg/ml, 温度 60°, 反応時間 3 時間, pH 7.5, 0.2 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4

酵素濃度で 5~6 時間で反応を終結せしめる限度といえる。酵素濃度は 200 mM グルタミン酸濃度において 10~20 mg/ml を必要とし、これ以上の場合にはさほど反応は促進されない。

更にこの反応では先に触れたように Cu^{++} イオンと PNSA のモル比が大きい影響を L-グルタミン酸の脱水反応に示すため、活性化反応速度もそのモル比によって大きく変化する。これを PNSA の添加量を変えた実験例で示せば第 8 図の如くなり、D-グルタミン酸、PNSA, Cu^{++} イオンのモル比が 1 : 0.2 : 0.1, つまりラセミグルタミン酸、PNSA, Cu^{++} イオンとして 1 : 0.1 : 0.05 が最適であり、それ以外では反応率は非常に悪い。ラセミ化の反応が 1 : 0.1 : 0.1 のモル比以上で反応速度は一定であったのに比べて興味のある事実で、L-グルタミン酸デヒドラーゼの反応機構と関係があるように思われる。L-グルタミン酸デヒドラーゼの基質特異性が L-グルタミン酸のみに限られ、L-グルタミン、L-アシルグルタミン酸等に活性を示さぬ事実⁽¹⁰⁾と考えると、グルタミン酸のアミノ基のみが Cu^{++} と PNSA との間の錯化合物の形成に関係して、 α , γ 両方のカルボキシル基は無関係である時のみ酵素的脱水反応が進行し、 α -位のカルボキシル基が錯化合物形成に関与している時には反応が阻害される事は今後検討の余地が残されている。

iv) 光学活性化反応 : 以上の如く諸条件についての実験結果より最適反応条件が決定されたが、その条件によりラセミグルタミン酸の光学活性化を行った一例を示すと第 2 表のようである。ラセミグルタミン酸の 80~85% を L-ピログルタミン酸として回収し、これを加水分解する事で L-グルタミン酸を得る事が出来るわけで、この反応液の加水分解物を分析の場合と同様に処理して pH 3.2 で結晶せしめたグルタミン酸の $[\alpha]_D^{25}$ は 31.8 ($c=3.5\%$, 2 N HCl) で明かに L-グルタミン酸である事が確認された。併し反応終了後のグルタミン酸は総て

第 2 表 光学活性化反応中のグルタミン酸の変化

反応時間 (時間)	L-グルタミン酸		全グルタミン酸	
	加水分解前	加水分解後	加水分解前	加水分解後
0	7.50	7.44	14.90	14.82
1	1.03	10.18	4.22	13.31
2	0.08	11.10	1.41	12.65
3	—	12.40	—	12.20
4	—	12.25	—	12.28
5	—	12.14	—	12.16

数値は mg/ml で表わす。

DL-グルタミン酸 100 μ M/ml, PNSA 10 μ M/ml, Cu^{++} 5 μ M/ml, 乾燥菌体 10 mg/ml, pH 7.5, 0.2 M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , 温度 65°

様、反応速度の温度による増加と触媒の安定性により決定されるが、この活性化反応ではラセミ化触媒については安定性はさほど問題にはならないから、最適温度を決定するのは L-グルタミン酸デヒドラーゼの活性の安定性といえる。この L-グルタミン酸デヒドラーゼは非常に高温でも安定で、最大活性は 70~80° で示されるが、90° でもその活性は失われない。光学活性化反応では第 7 図に示したように Cu^{++} イオンと PNSA の影響のため、やや低くなるが 60~70° が最も急速にラセミグルタミン酸の活性化が進行する。80° 及び 40° では反応は殆んど進行しない。つまり 80° 以上では L-グルタミン酸デヒドラーゼの活性が低下するため、40° 以下では非酵素的ラセミ化が進行せぬため、活性化は起りにくい。

iii) 基質濃度並びに酵素濃度 : L-グルタミン酸デヒドラーゼは L-グルタミン酸濃度が 1 M 以上でも充分脱水反応を起すが、活性化反応では同時に Cu^{++} イオン及び PNSA の濃度も高くなるためこの影響があり、基質濃度は 200 mM 程度が 10 mg/ml の

L-型に変換されているが、全グルタミン酸は約 15% 程度減少し、この減少の原因は非酵素的脱アミノ基反応によるものと考えられる。このグルタミン酸の損失は光学活性化反応における D-グルタミン酸のラセミ化を非酵素的に行っている以上、さける事の出来ぬものであるが、すでに特異的なグルタミン酸ラセマーゼについては二、三の報告^(11,12)があり、このような酵素的なラセミ化を L-グルタミン酸の酵素的脱水反応と共に起さしめる事により更に収率よくラセミグルタミン酸を活性化し得るものと考えられる。この点については現在実験検討中である。

要 約

(1) *Pseudomonas cruciviae* var. *ovalis* の生産する L-グルタミン酸デヒドラーゼによる L-グルタミン酸の酵素的脱水反応

と、*p*-ニトロサルチルアルデヒドと Cu^{++} イオンを触媒とするグルタミン酸の非酵素的ラセミ化反応とを同時に連続的にラセミグルタミン酸に起さしめて、L-ピログルタミン酸を経てラセミグルタミン酸を光学的に活性化することを試みた。

(2) Cu^{++} イオンと *p*-ニトロサルチルアルデヒドによるグルタミン酸の非酵素的ラセミ化は非常に速く、その最適 pH, 100° での反応で 2 時間にして完全にラセミ化される。その最適 pH は 10 以上であり、pH 3.0 にやや反応率の高い pH があるが、これはアミノ基の解離に原因するラセミ化と考えられる。この非酵素的ラセミ化ではグルタミン酸の一部が脱アミノ化されるようでその率は 15% 程度である。反応最小モル比はグルタミン酸、*p*-ニトロサルチルアルデヒド、 Cu^{++} イオンが 1:0.1:0.1 である。又反応速度は 10° の温度の上昇で約 2 倍となる。ピログルタミン酸に関してはどのような条件でもこの非酵素的ラセミ化反応は起らず、これはピログルタミン酸がアミノ基を有さず、アルデヒド及び Cu^{++} イオンと錯化合物の形成をせぬ事によると思われる。

(3) L-グルタミン酸デヒドラーゼは *p*-ニトロサルチルアルデヒド及び Cu^{++} イオンの存在下でも L-グルタミン酸の脱水を行い L-ピログルタミン酸を与える。併しこの場合グルタミン酸、*p*-ニトロサルチルアルデヒド、 Cu^{++} イオンのモル比は 1:0.2:0.1 が最適でこれ以外では活性が低下する。

(4) 上記両反応の組合せによるラセミグルタミン酸の光学活性化により、ラセミグルタミン酸は L-ピログルタミン酸を経て L-グルタミン酸に変換される。この活性化反応の最適 pH は 7.5、最適温度は $60\sim 70^\circ$ 、基質濃度は 10 mg/ml の *P. cruciviae* の凍結乾燥菌体を使用した場合 200 mM のラセミグルタミン酸濃度が最も良好であった。この活性化反応でのグルタミン酸、*p*-ニトロサルチルアルデヒド、 Cu^{++} イオンの最適モル比は 1:0.1:0.05 であった。このモル比は L-グルタミン酸デヒドラーゼの反応機構と関係があると考えられる。

(5) ラセミグルタミン酸の光学活性化反応により基質ラセミグルタミン酸の 80% 程度を L-ピログルタミン酸を経て、これを加水分解して L-グルタミン酸を得るが、この反応液中のグルタミン酸は完全に L-異性体で活性化率は 100% であるので、この収率 80% はグルタミン酸の非酵素的脱アミノ反応によると考えられる。それ故本方法による収率は 80% 程度が限度と思われるので、酵素物な特異的ラセミ化による方法を検討中である。

- (1) 田中正生, 長野雄治, 木下祝郎: 本誌投稿中.
- (2) D. E. Metzler, M. Ikawa, E. E. Snell: *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 648 (1954).
- (3) E. E. Snell: *Vitamins and Hormones*, XVI, 77~125 (1958).
- (4) J. Olivard, D. E. Metzler, E. E. Snell: *J. Biol. Chem.*, 199, 669 (1952).
- (5) 大野 光, 佐々治一郎, 原 稔: 日本化学会第 12 年会 (1959).
- (6) J. R. Segesser, M. Calvin: *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, 825 (1942).
- (7) 妻木徳一, 太田 浩, 堤 達也: 日化誌, 74, 859 (1953).
- (8) J. B. Himes, L. D. Metcalfe: *Anal. Chem.* 31, 1192 (1959).
- (9) G. N. Zaitzeva, N. P. Tynlenova: *Lab. Delo.*, 4(3), 24 (1958); *Anal. Abstr.*, 6, 678 (1959).
- (10) S. Akita, K. Tanaka, S. Kinoshita: *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1, 179 (1959).
- (11) P. Ayengar, R. E. Roberts: *J. Biol. Chem.*, 197, 453 (1952).
- (12) S. A. Narrod, W. A. Wood: *Arch. Biochem. Biophys.*, 35, 462 (1952).