Streptomyces caespitosus の生産する酵素に関する研究 (第 2 報)

中性プロテアーゼの結晶化と諸性質について

横手 保治, 野口 祐一

(協和醸酵工業株式会社防府工場)

昭和 43 年 7 月 15 日 受理

Studies on Enzymes Produced by *Streptomyces caespitosus* Part II. Crystalization and Some Properties of Neutral Protease

By Yasuharu YOKOTE and Yūichi NOGUCHI

Hofu Plant, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

A crystalline neutral protease was prepared from *Streptomyces caespitosus*. The recrystallized protease appeared homogeneous on electrophoretic and ultracentrifugal analyses. Its sedimentation coefficient was, $s_{20w} = 1.92 \times 10^{-13}$ and molecular weight was 15,000. The enzyme had the following elemental composition; C, 45.53%; H, 6.67%; N, 16.05%; S, 1.00%; Ash, 0.67%. The activity and stability of the crystalline protease are identical with F-II described in the preceding paper. The specific activity of the crystalline enzyme is about 40 times more than that of the crude enzyme preparation which hydrolyzed 56% of the peptide bonds in casein. On the other hand, the crystalline enzyme hydrolyzed only 10%. It was shown to be free from carboxypeptidase and aminopeptidase activities by the incubation with synthetic peptides. (Received July 15, 1968)

緒 言

著者らは前報⁽¹⁾において, *Streptomyces caespitosus* が強力かつ, 多量の中性プロテアーゼを生産することを見出し, その培養液から, クロマトグラフィー的に 3 種類のプロテアーゼを分離して, それらの 2, 3 の性質について報告した。

このプロテアーゼは基質に対する特異性が低く, 蛋白質をほとんどアミノ酸単位に加水分解する点で興味ある酵素と考えられた。しかし, 前報までの精製酵素には peptidase の混入が認められたので, さらに精製した結果, 中性プロテアーゼの一つを結晶状に得ることができた。本報では, 結晶化ならびに, 結晶酵素の酵素的性質および物理的性質について報告する。

実 験 方 法

使用酵素 : 前報⁽¹⁾のごとく, *Streptomyces caespitosus* の培養液から, 硫酸アンモニウム塩析によって得た粗酵素をセロファンチューブにより透析後, アセトンで沈澱せしめて得たアセトン乾燥粉末を用いた。このもの

のプロテアーゼ力価は 60,000 PU/g である。

プロテアーゼ力価の測定法 : 前報⁽¹⁾において詳記した Casein-Folin 法によった。

蛋白質加水分解度の測定法 : 前報⁽¹⁾に詳記した Casein-formol 滴定法によった。

実 験 結 果

Streptomyces caespitosus プロテアーゼの結晶化

1) イオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィー
粗酵素を大量に精製する目的のもとに, イオン交換樹脂によるプロテアーゼの吸着を試みた。樹脂を種々検討したのち, Amberlite CG-50 600 ml を 0.1 M 酢酸ソーダ-塩酸緩衝液 (pH 4.7) で緩衝化し, 同緩衝液中で透析を行なった粗酵素液 1,560,000 PU を通塔した。色素および不純物の大部分は流出するが, プロテアーゼの 87% が吸着された。樹脂塔を約 6 l の脱イオン水で水洗したのち, 0.001 M 酢酸カルシウムを含有する 0.8 M 酢酸ソーダ緩衝液 (pH 7.4) を $SV=0.5$ で通塔, 溶出した。溶出曲線を Fig. 1 に示す。吸着された 87% のプロテア

Fig. 1. Elution Profile of *St. caespitosus* Protease.

Amberlite CG-50 column (9×50 cm) was prepared in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.7. 1,560,000 units of crude protease (obtained from culture broth by ammonium sulfate precipitation method) was dialyzed against the same buffer, loaded on the column. The column was washed with 6 liters of deionized water and eluted with 0.8 M sodium acetate buffer, pH 7.4, which contained 0.01 M calcium acetate. A flow rate; SV=0.5.

—○— Protease activity
 --- Optical density at 430 mμ.

ーゼは、水洗によりその約 5% が色素とともに流失した。溶出に際し、吸着されている酵素の 49% がプロテアーゼ濃厚部分として回収された。溶出酵素液はまだ濃い褐色を呈しており、peptidase の混入も認められた。

2) 硫酸アンモニウム塩析および透析

溶出酵素液に粉末硫酸アンモニウムを 0.6 飽和まで加

え、生ずる沈澱を集め、0.01 M 酢酸カルシウム溶液に再び溶解し、0.001 M 酢酸カルシウムを透析外液として、5°C で 1 夜透析する。この硫酸アンモニウムによる塩析操作により約 30% のプロテアーゼが損失する。硫酸濃度を 0.72 飽和にすれば回収率は約 95% になるが、以後の結晶化操作は著しく困難となった。

3) アセトンによる結晶化 (1 次結晶)

透析酵素溶液中の不溶解物を遠心分離後、冷却したアセトンを徐々に滴下する。酵素溶液の 0.5~0.8 倍量の冷アセトンを加えたのち、生じた沈澱を直ちに遠心除去する。遠沈上清を 5°C に静置すると 1~2 日後より、プロテアーゼは針状結晶として析出をはじめ、約 1 週間で析出が終了する。Fig. 2 (a) に得られた針状結晶写真を示す。この結晶酵素はやや褐色を帯びており、水に易溶性である。この針状結晶酵素 40 mg を、pH 4.7 に緩衝化した CM-Sephadex C-50 カラムに通した結果を Fig. 3 に示す。この結晶は前報⁽¹⁾の F-II に相当する中性プロテアーゼであり、F-III は完全に除去されているが、F-I に相当するプロテアーゼが少量含まれている。以下、この段階の針状結晶を 1 次結晶と呼称する。

4) 水による再結晶 (2 次結晶)

アセトン添加により得た 1 次結晶を 0.001 M 酢酸カルシウム水溶液に 50 mg/ml 程度の濃度に溶解し、直ちに、遠心分離により不溶解物を除去したのち、5°C に静置すると次第に絹光沢の濁りを生じ、板状結晶となる。さらに 5~7 日静置すると結晶は次第に大きくなり塊状を呈する。Fig. 2 (b) に結晶写真を示す。この結晶を針状結晶と区別するため 2 次結晶と呼ぶことにする。2 次結晶

Fig. 2. Microphotograph Showing the Crystalline Protease of *St. caespitosus*.

(a) First crystal obtained by acetone addition.

(b) Second crystal obtained by recrystallization in 0.01 M calcium acetate solution.

Fig. 3. Chromatography of the First Crystalline Protease of *St. caespitosus* on CM-Sephadex G-50.

A 70×1.9 cm column was prepared in 0.01 M sodium acetate buffer, pH 4.7. 40 mg of the first crystalline protease was dissolved in 15 ml of the same acetate buffer. Linear gradient elution was employed. The mixing chamber contained 1 liter of the above mentioned buffer and the reservoir contained 1 liter of 0.2 M acetate buffer, pH 7.0, with 0.2 M NaCl. Fraction of 10 ml were collected at a flow rate of 40 ml per hour.

—○— Protease activity
 --- Ultraviolet absorption at 280 mμ

Table I. Crystallization Procedure of the Protease of *St. caespitosus*

1. Filtrate culture broth	
Added ammonium sulfate to make the final conc. of 0.72 sat. at pH 7, added filter aid and filtered.	
2. Precipitation	
Dissolved in tap water, filtered and dialyzed with cellophane membrane against running water overnight, centrifuged.	
3. Dialyze	
Charged on Amberlite CG-50 column which was bufferized with 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.7), washed the column with water and eluted with 0.8 M sodium acetate buffer (pH 7.4) contained 0.01 M calcium acetate.	
4. Eluate	
Added ammonium sulfate to make the final conc. of 0.6 sat., dissolved in 0.01 M calcium acetate, dialyzed against 0.01 M calcium acetate.	
5. Dialyze	
Added acetone to make 40%, centrifuged, kept for 2 weeks at 5°C.	
6. First crystal	
Recrystallized in 0.01 M calcium acetate.	
7. Second crystal	

Table II. Specific Activity and Step Yield in Isolation Procedure of *St. caespitosus* Protease.

Step	PU/ml or g	Protein-N mg/ml or g	Specific activity PU/Protein-N mg	Yield %
1. Filtrate culture broth	320	0.42	760	100
2. Ppt. with (NH ₄) ₂ SO ₄	12,000	10.60	1,038	80
3. Dialyze	1,427	1.37	1,040	59
4. Eluate from Amberlite CG-50 column	322	0.22	1,464	24
5. Dialyze	5,350	3.24	1,650	24
6. First crystal	361,400	176.0	2,054	8
7. Second crystal	430,000	161.0	2,671	7

は全く着色しておらず、水または希薄塩類溶液に対して難溶性である。この結晶を溶解するには、pH を9以上にする必要があり、通常、水酸化カルシウム飽和水溶液の少量に溶解後、pH 7.4 の緩衝液で希釈した。水酸化カルシウム飽和水溶液の少量に結晶を溶解し、pH 7.4 の緩衝液を透析外液として、セロファン透析を行なえば、セロファンチューブ内に均一な結晶が得られた。この操作を2回行なって得た結晶を以後の実験に使用した。培養液からの結晶化工程を Table I に、また、各工程の酵素比活性および精製収率を Table II に示す。

結晶プロテアーゼの単一性

1) CM-Sephadex カラムクロマトグラフィー

2 次結晶酵素 40 mg を、pH 4.7 に緩衝化した CM-

Fig. 4. Chromatography of the Second Crystalline Protease on CM-Sephadex G-50.

40 mg of the second crystalline protease of *St. caespitosus* was treated in the same condition as described in Fig. 3.

—○— Protease activity
 --- Ultraviolet absorption at 280 mμ

Sephadex カラムに通したクロマトグラムを Fig. 4 に示す. 結晶酵素は前報⁽¹⁾の F-II に相当する単一プロテアーゼとして溶出してくる. クロマトグラム上で初めの流出液中に認められる小さな蛋白質のピークは, プロテアーゼ活性を示さず, 酵素液を長時間放置すると次第に増加することより, プロテアーゼの自己消化物と考えられる.

2) 電気泳動

2 次結晶を水酸化カルシウム飽和水溶液 1 滴を加えた水 1 ml に溶解後, 0.001 M 酢酸カルシウムおよび 0.05 M NaCl を含有する 0.05 M トリスアミノメタン-塩酸緩衝液 (pH 8.6) に対して, 5°C 1 夜透析し, Fig. 5 に示した条件のもとで, チゼリウス型電気泳動装置によって電気泳動を行なった結果, 電気泳動的に

Fig. 5. Electrophoretic Pattern of the Crystalline Protease.

The electrophoresis was carried out at 108 V, 10 mA and 7.6°C. The enzyme concentration was 0.8% in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.6, containing 0.001 M calcium acetate and sodium chloride which was added to adjust ionic strength to 0.055.

Fig. 6. Sedimentation Pattern of the Crystalline Protease in the Ultracentrifuge.

The enzyme solution in a synthetic boundary cell was spun at 55,900 rpm in a Hitachi Model UCA-1 analytical ultracentrifuge. The Schlieden patterns are shown at the indicated periods after attainment of full centrifuge speed. The arrow indicates the direction of movement of boundary. The sedimentation velocity was determined with 0.5% enzyme solution in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.25, containing 0.01 M calcium acetate.

は単一と認められた.

3) 超遠心沈降

2 次結晶酵素を 0.001 M 酢酸カルシウムを含有する トリスアミノメタン緩衝液 (pH 9) に溶解後, 塩酸で pH 8.6 に調整し, pH 8.6 トリスアミノメタン-塩酸緩衝液に 1 夜透析後, 日立分析用超遠心機 UCA-1 型で超遠心沈降図を求めた. その結果は Fig. 6 に示すように, 超遠心的に単一であることが認められた.

結晶プロテアーゼの物理化学的性質

1) 紫外線吸収曲線

トリスアミノメタン-塩酸緩衝液 (pH 8.8), および, 0.1 N NaOH に溶解した結晶酵素液の紫外線吸収曲線を Fig. 7 に示す. 通常の蛋白質の吸収曲線を示し, 277 m μ に最大吸収が認められた. 277 m μ において, $E_{cm}^{1\%} = 15.5$ であった.

2) 沈降速度定数および分子量

2 次結晶を溶解後, 0.001 M 酢酸カルシウムを含有する トリスアミノメタン-塩酸緩衝液中で 1 夜透析し, 分析用超遠心機により沈降速度定数を求めた. $s_{20,w} = 1.95$ S であり, 偏比容を 0.73 とすると, この酵素の分子量は Archivald 法⁽²⁾により 15,000 となった.

3) 元素分析

2 次結晶の元素分析の結果は, 次のとおりであった. C: 45.53%, H: 6.67%, N: 16.05%, S: 1.00%, Ash: 0.67%

Fig. 7. Ultraviolet Absorption Spectra of the Crystalline Protease.

Cuvette with 1.0cm light path contained 0.4 mg of the crystalline protease per ml dissolved in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 (—) and in 0.1 N NaOH (---). Measurements were made on a Hitachi recording spectrophotometer Model EPS-3.

結晶酵素の酵素的諸性質

酵素活性および酵素安定性におよぼす pH の影響について調べた。すでに報告⁽¹⁾した F-II と全く等しい性質を示した。すなわち、結晶酵素の至適 pH は 7~8 にあり、安定範囲は 5~8 であった。温度の影響についても、F-II と全く等しい結果を示した。基質としてカゼインを用い 10 分間加水分解反応を行なわせるとき、55°C 付近に最適 pH が認められた。温度安定性についても F-II と同様に、Ca イオンにより耐熱性が高められ、2 時間加熱の条件下で 50°C まで安定であった。

酵素活性におよぼす金属イオンと阻害剤の影響

酵素を Table III に示す 2×10^{-3} M の各種金属塩溶液および、 5×10^{-3} M の各種阻害剤溶液に溶解し、22°C に 2 時間静置後、残存する酵素活性を測定した。Ag, Sn, Hg, Pb により完全に失活した。一方、酵素活性を促進する金属イオンは認められなかった。また、各種阻害剤のうち、carboxypeptidase その他の metal protein の活性を阻害する azide, および cyanide にはこの酵素は阻害作用を受けず、SH 基に作用する阻害剤にも全く影響されなかった。一方、S-S 結合に作用するものはこの酵素活性を阻害した。その他、 I_2 , N-bromosuccinimide, $KMnO_4$ は酵素活性を阻害した。EDTA は 2.5×10^{-4} M で完全に阻害し、 2.5×10^{-6} では 71% の阻害を示した。

Table III. Effect of Various Reagents on the Activity of the Crystalline Protease

Reagent	Concentration (M)	Inhibition (%)
Ca(CH ₃ COO) ₂	2×10^{-3}	0
MgSO ₄	"	0
CoCl ₂	"	0
BaCl ₂	"	7
Na ₂ WO ₄	"	17
ZnSO ₄	"	18
FeSO ₄	"	70
NiSO ₄	"	79
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	"	88
CuCl ₂	"	79
SnCl ₂	"	100
AgNO ₃	"	100
Pb(NO ₃) ₂	"	100
EDTA	5×10^{-3}	100
"	5×10^{-5}	72
"	5×10^{-7}	20
Ammonium oxalate	5×10^{-2}	16
Sodium citrate	"	22
NaN ₃	5×10^{-3}	0
KCN	"	12
CH ₃ ICOOH	"	1
p-Chloromercuribenzoate	"	4
Oxidized glutation	"	0
Thioglycolic acid	"	90
Reduced glutation	"	78
2-Mercaptoethanol	5×10^{-2}	100
Cysteine	5×10^{-3}	62
Phenylazobenzyl chloride	"	0
Phenylhydrazine	"	0
Hydroxylamine-HCl	"	0
Diisopropyl fluorophosphate	"	100
Iodine	"	100
N-Bromosuccinimide	"	100
KMnO ₄	"	100
KNO ₂	"	2

The enzyme was pre-incubated with the reagents at 22°C for 2 hr, pH 7.4. After pre-incubation, the enzyme solutions (3×10^{-4} M/ml) were diluted with 0.02 M phosphate buffer, pH 7.4, and protease activity was assayed by Casein-Folin method.

結晶酵素のカゼイン分解率

2% カゼイン溶液 (pH 7.4) に、粗酵素粉末、1 次結晶酵素および 2 次結晶酵素を各々 200 PU/100mg-casein の割合に添加し、37°C で加水分解反応を行なわせ、経時的にサンプリングし、Casein-formol 滴定法で加水分解率を測定した。結果は Fig. 8 に示すように、粗酵素は塩酸分解に対して 55% の加水分解力を持つが、1 次結晶

Fig. 8. Hydrolysis of Casein by the Protease of *St. caespitosus*.

The reaction mixture contained 500mg of milk casein, 1000 units of protease and 0.02 M phosphate buffer, pH 7.4. The total volume was 25 ml. 5 ml of the reaction mixture was removed at different time intervals of incubation at 37°C, the liberated carboxyl radical was determined by formol titration. The symbol (↓) indicates where crude enzyme were added.

----- Hydrolysis by second crystalline protease.
 - - - - - Hydrolysis by first crystalline protease.
 ——— Hydrolysis by crude protease of *St. caespitosus*.

では 30%, 2 次結晶では 10% の分解にとどまった。

結晶酵素の合成基質に対する作用

粗酵素, 1 次結晶酵素および 2 次結晶酵素の間でカゼインの加水分解率が異なる現象を明らかにするため, 合成基質に対する作用特異性について調べた。結果は Table IV に示すように, 粗酵素には aminopeptidase, carboxypeptidase, および dipeptidase 作用が認められたが, 2 次結晶にはこれらの exopeptidase 作用は認められなかった。しかし, エステラーゼ作用およびアミダーゼ作用があり, フェニルアラニン, チロシンの芳香族アミノ酸のエチルエステルを加水分解した。また, これら芳香族アミノ酸のエチルエステルのアセチル化合物は, アセチル結合およびエステル結合の両部分で水解された。また, Cbz-Gly-L-Phe-NH₂, N-Bzo-L-Tyr-NH₂ および N-Ac-L-Tyr-NH₂ 等はアシル結合, ペプチド結合が水解されたのに対して, C 末端がアミド化されていない場合はいずれも水解されなかった。以上の事実は結晶酵素はフェニルアラニン, トリプトファンの芳香族アミノ酸に親和性があるが, 遊離カルボキシル基の存在が

Table IV. Action of the *St. caespitosus* Protease on Synthetic Substrates

	Crystalline	Crude
Gly-Gly	—	Gly 5%
Gly-L-Leu	—	—
DL-Leu-Gly	—	Leu, Gly 69%
Gly-DL-Ala	—	Gly, Ala 31%
DL-Ala-Gly	—	Ala, Gly 47%
DL-Ala-DL-Ala	—	Ala 25%
Gly-DL-Asp	—	—
Gly-L-Val	—	—
Gly-DL-Norleu	—	—
DL-Leu-Gly-Gly	—	Leu 100%, Gly 55%, Gly-Gly 45%
Cbz-Gly-L-Phe-NH ₂	Phe 10%	Phe(NH ₂) 100%
Cbz-Gly-L-Phe	Phe 10%	Phe 100%
Cbz-Gly-Gly	—	—
Cbz-L-Glu-L-Phe	Phe 4%	Phe 78%
Cbz-L-Glu-L-Tyr	—	Tyr 90%
Cbz-Gly-L-Leu	—	Leu 95%
L-Phe-OEt-H ₂ O	Phe 70%	Phe 100%
L-Tyr-OEt	Phe 70%	Tyr 100%
N-Ac-DL-Leu	—	Leu 50%
N-Ac-Gly	—	Gly 100%
N-Ac-DL-Met	—	Met 50%
N-Ac-DL-Try	—	Try 50%
N-Ac-DL-Phe	—	Phe 50%
N-Ac-L-Phe-OEt	Phe 10%	Phe 10%
N-Ac-L-Tyr-OEt-H ₂ O	Tyr 13%	Tyr 100%
N-Ac-L-Tyr-NH ₂	Tyr-NH ₂ 10%	Tyr-NH ₂ 100%
N-Ac-L-Glu-NH ₂	—	Glu, Glu-NH ₂
N-Ac-O-Ben-DL-Ser	—	Ser 50%
N-Chac-DL-Ala	—	Ala 50%
N-Chac-DL-Val	—	Val 50%
N-Chac-DL-Ser	—	Ser 50%
N-Chac-DL-Ileu	—	Ileu 50%
N-Bzo-L-Arg-OEt-HCl	—	Arg-OEt
N-Bzo-L-Arg-NH ₂ -HCl	—	Arg-NH ₂ 50%
N-Bzo-L-Tyr-OEt	Tyr-OEt 2%	Tyr 100%
N-Bzo-L-Tyr-NH ₂	Tyr-NH ₂ 5%	Tyr-NH ₂ 100%

The reaction mixture contained M/400 of synthetic substrates, 100 PU/ml of protease and 0.02 M phosphate buffer, pH 7.4. Hydrolysis ratio was measured by paper partition chromatography after incubation at 37°C for 48 hr.

加水分解に好ましくない影響を与えることを示している。これらの性質はキモトリプシン⁽⁸⁻¹⁰⁾の作用に類似している。

考 察

結晶状に得たプロテアーゼは、アセトン添加により晶出した1次結晶と水から再結晶した2次結晶の間で結晶形が異なっている。酵素の結晶の中にも、その晶出条件によってポリモルフィズムを示すものが知られているが⁽⁹⁻⁶⁾、1次結晶と2次結晶の間に認められる水に対する溶解度の差、カゼイン分解率の差は両酵素間に酵素蛋白上の差があるとも推察される。1次結晶にはまだ peptidase の混入が認められるが、再結晶により除かれる。このもののカゼイン分解率は10%であり、大内ら⁽⁶⁾の *Streptomyces griseus* ATCC 3463 のアルカリプロテアーゼや、奈良橋ら⁽⁷⁾がプロナーゼから分離した Proteinase I の加水分解率と等しい値である。*St. caespitosus* の結晶酵素は exopeptidase 活性をもたない、いわゆる proteinase であるが、エステラーゼ、アミダーゼ両作用を有すること、およびC末端がフリーでない芳香族アミノ酸に作用する点でキモトリプシンの作用に類似している。そのほか DFP、重金属により阻害を受ける点でもキモトリプシンに共通している。一方、粗酵素は結晶酵素が加水分解しないペプチドを水解することから、結晶として単離した酵素のほかにペプチダーゼ類を含有していることを示している。さらに多くのアシルアミノ酸を水解するアシラーゼを含有する点は野本ら⁽¹¹⁾の *St. griseus* と異なっている。このアシラーゼについては、プロテアーゼ生産との関連において興味ある点である。

要 約

(1) *Streptomyces caespitosus* の中性プロテアーゼを Amberlite CG-50 樹脂吸着、硫酸塩析、アセトン分別により結晶状に精製分離した。結晶プロテアーゼは *St. caespitosus* が生産する3つのプロテアーゼ⁽¹⁾のうちの、F-II に相当するものであった。結晶のプロテアーゼ力価は 430,000 PU/g であり、酵素的性質は F-II のそれと同じであった。しかし、Casein-formol 滴定法により測定したカゼイン分解率は10%であり、F-II の 1/5.5 に低下した。合成ペプチドに対する作用を調べた結果、粗酵素に存在する aminopeptidase 作用, carboxypeptidase 作用および dipeptidase 作用は再結晶化の段階で

失われるが、エステラーゼ作用が認められ、基質特異性の上でキモトリプシンに類似していた。

(2) 酵素活性を促進する金属塩はなく、Ca イオンに熱安定性の保護作用が認められた。Ag, Sn, Hg, Pb は強い酵素活性の阻害を示した。また EDTA, DFP, NBS, I₂, KMnO₄ により失活した。SH 基に作用する阻害剤には全く影響を受けなかったが、S-S 結合の還元により失活した。

(3) 結晶酵素は電気泳動的にも超遠心的にも単一蛋白質と認められ、その沈降定数は $s_{20,w} = 1.95 \times 10^{-13}$, 分子量は約 15,000 であった。

(4) 元素分析の結果は、C : 45.53%, H : 6.67%, N : 16.05%, S : 1.00%, Ash : 0.67% であった。

終りに、酵素の物理的性質究明に関して御指導いただいた阪大理学部萩原文二教授、蛋白研垣内欣二および高木俊夫両博士に深謝いたします。また発表を許可された当社加藤辨三郎社長、終始御指導、御鞭撻を賜った高田弘専務、松沢辰男工場長に感謝いたします。

なお、本報告の一部は昭和 39 年度日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) 横手保治, 川崎和徳, 中島潤一, 野口祐一: 農化, **43**, 125 (1969).
- (2) W. J. Archibald: *J. Phys. Chem.*, **51**, 1204 (1947).
- (3) 三宅 捷, 吉村貞彦, 吉村康郎: 兵庫農大研報, **3**, 147 (1958).
- (4) J. F. Tayler, A. A. Green, G. T. Cori: *J. Biol. Chem.*, **137**, 591 (1948).
- (5) 斎藤恒行, 石原義雄: 農化, **30**, 430 (1956).
- (6) 大内 毅, 平松 昭: 第 13 回酵素シンポジウム講演集, p. 62 (1962).
- (7) 奈良橋快子, 柳田正也: 農化大会発表 (1967).
- (8) S. Kaufmann, G. W. Schwert, H. Neurath: *J. Biol. Chem.*, **177**, 203 (1948).
- (9) M. Bergmann *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **111**, 225 (1935); *ibid.*, **118**, 405 (1937); *ibid.*, **124**, 321 (1938); *ibid.*, **145**, 253 (1942).
- (10) 泉屋信夫ら: *J. Biochem.*, **46**, 19 (1959).
- (11) 野本正雄, 奈良橋快子: 理研報告, **34**, 381 (1958).