ヒジキ不ケン化物からのフィトールの単離と その膵リパーゼ活性促進作用*

小村 毅, 長山英男**, 和田せつ
(仙台白百合短期大学, **東北大学抗酸菌病研究所)

昭和 49 年 3 月 11 日 受 理

Isolation of Phytol from the Hiziki Unsaponifiable Matter and Its Activating Effect on Pancreatic Lipase Activity (Studies on the Lipase Activator in Marine Algae Part IV)

By Takeshi KOMURA, Hideo NAGAYAMA** and Setsu WADA
Sendai Shirayuri Junior College, Izumi, Miyagi-ken; **The Research
Institute for Tuberculosis, Leprosy and Cancer, Tohoku University, Sendai

In the previous report, the residual fraction (residue) after extraction of fucosterol from the unsaponifiable matter of *Hizikia fusiformis* (hiziki) was found to possess essentially the same remarkable accelerating activity on pig pancreatic lipase as that of the unsaponifiable matter. Hence, the isolation and identification of the active principles from the residue were attempted, and the activity of three activators was investigated.

One of the activators isolated from the residue was identified as phytol, a diterpene, by means of TLC and IR and MS spectrometry, thus providing the first demonstration of phytol in hiziki. Phytol, a new lipase-activator, was found to exhibit a more remarkable (250 to 300%) stimulating action than the residue itself (150 to 170%) on lipolysis when tested with triacetin as substrate.

Other two activators, A-3 and A-9, isolated from the residue were suggested to belong to terpenes and sterols, respectively, and A-3 showed an activating effect essentially similar to that of phytol.

Accordingly, some other terpenes (from different sources) were compared of their lipase-activating activity, and farnesol proved to be the most active, essentially to the same degree as phytol, but nerol, β -carotene, and α -tocopherol to be far less active. Thus, the requirement for the optimal isoprene units in the activator molecule was suggested. (Received March 11, 1974)

緒 言

筆者らはこれまで、ヒジキ不ケン化物中の豚膵リパーゼ活性を著明に促進する物質 (activator)⁽¹⁾ を問題にしてきた。すなわち、不ケン化物中の activator の主体は、先に単離・同定した褐藻類特有のフコステロールではなく⁽²⁾、その抽出「残渣」画分にある^(3,4) こと、およびこの残渣の TLC 画分いずれにも、基本的には残渣と

同程度の活性が存在する⁽⁴⁾ ことを報告した。

そこで今回は、さらにこの残渣画分から activator の有効成分を単離し、その構造を明らかにするとともに、リパーゼ活性に対する促進作用を酵素動力学的に検討した。その結果、残渣より単離した新促進物質の一つは、ジテルペンに属するフィトールであり、このものは残渣または不ケン化物よりも、強い促進効果を示すことが明らかとなった。なお、このほかの activator として、一種のテルペンおよびステロールを推定した。またこのような activator 作用を、炭素鎖長を異にする海藻以外の

* 海藻からのリパーゼ活性促進物質に関する研究 (第 4 報)。前報, 文献 (4) 参照。

二, 三のテルペン類について比較した.

実験方法

1. 薄層クロマトグラフィー (TLC) 定性および分取 TLC は, 基本的に前報⁽⁴⁾と同様に行なった.

2. 残渣画分からの activator の単離と同定

1) フィトールの単離・同定: 前報⁽⁴⁾に述べたように, ヒジキ不ケン化物からフコステロールを抽出した残渣 900 mg を, 分取 TLC で R_f 値の高い順に 12 のフラクション (Fr. 1~12 と略す) に分けた. このうち, 今回はまず, フィトールを含む Fr. 6 と 7 (約 65 mg) から, Fig. 1 に示すように, TLC 法 [ヘキサン-酢酸エチル (5:1)] で 2 回精製して, 淡黄色の油状物質 (約 10 mg) を得た.

このようにして単離したフィトールを, 標品 (東京化成製フィトールを上と同様の方法で精製したもの) を用いて, TLC の R_f 値, IR, MS スペクトルにより同定した. また, これら両フィトールを以下の activator の活性測定に用いた.

2) その他の activator の単離と分析: 次に, 以上の残渣の TLC-画分のうちフィトール以外の activator の成分を二つ精製した. すなわち, TLC 上フィトールより高い R_f を示す Fr. 3 (約 55 mg) と, フコステロールのすぐ下の Fr. 9 (約 57 mg) から, Fig. 1 に示すように, それぞれヘキサン-酢酸エチル (5:1) とベンゼン-酢酸エチル (7:3) を展開剤とする TLC 法で, 約 8

Table I. Conditions for Assaying the Activator Effect on Lipase Activity*

Triacetin	0.25 ml
Activator**	1.0 mg
0.2 M Phosphate buffer (pH 7.4)	1.0 ml
Pig pancreatic lipase (Wako)	20.0 mg
Total volume: 10 ml, at 27°C, 90 min	

* Lipase activity was measured by titrimetric method with a pH-stat and expressed as ml of 0.05 N NaOH, as before.^(1,2)

** 1.0 mg of isolated phytol, or other activators to be tested, in 1.0 ml of ether.

The preparation of enzyme, order of activator addition and other reaction conditions were the same as described previously.⁽²⁾

mg の油状物質 (以下, A-3 とする) および約 9 mg の結晶性ステロール (A-9 とする) を単離した.

これらの分析は, 定性 TLC, mp, Liebermann-Burchard 試験, ジギトニン沈殿反応および IR スペクトルにより検討した.

3. 酵素活性の測定法 活性の測定は, Table I に示すとおり, トリアセチンを基質とするこれまでの方法⁽²⁾で行なった. フィトールの促進効果を検討する際, activator の対照として, 前回有効と認めた残渣画分⁽⁴⁾を常に用いて比較した. また, 促進作用をフィトールと比較するのに, 他のテルペン, すなわち β -カロチン (和光製), ファルネソール, ネロール (ともに東京化成製), およびこれらに関連して α -トコフェロール (半井化学薬品製) をそれぞれ用いた.

実験結果

1. 単離したフィトールの同定

上記 2-1) の方法により, Fr. 6, 7 から単離した物質がフィトールであることを, 標準フィトールを用いて次のように同定した. まず, Fig. 2 の定性 TLC から明かなように, 単離したもの (スポット 2) は, 色調および R_f 値が標品 (スポット P) と良く一致し, 単一であった. Fig. 3 の IR でも, 単離したもの (実線) は標品 (点線) と全く同じスペクトル [$\nu_{\max}^{\text{film}}$ 3340 cm^{-1} (OH), 2920 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$), 1665 cm^{-1} ($\text{C}=\text{CH}$), 1465 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$), 1380 cm^{-1} , 1000 cm^{-1}]

Fig. 1. Isolation of the Three Activators from the Residual Fraction.

* Solvent systems for TLC (0.5 mm layer of silicic acid): for Fr. 6, 7 and Fr. 3, hexane-EtOAc (5:1); for Fr. 9, benzene-EtOAc (7:3). Double development. Detection of spots: conc. H_2SO_4 , SbCl_3 , or UV.

Fig. 2. Thin-layer Chromatogram of Phytol Isolated from Residual Fraction.

Spots: 0, residual fraction; 1, Fr. 6(7), one of TLC-fractions; 2, isolated phytol; P, standard phytol.

Solvents: (a), benzene-EtOAc (9:1); (b), hexane-EtOAc (5:1). Detection of spots: (a), 25% SbCl_3 in CHCl_3 ; (b), conc. H_2SO_4 .

を示した。さらに, Fig. 4 に示した MS も, 標品とフラグメンテーションパターン [$296(\text{M}^+)$, $278(\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O})$, $263(\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3)$, $253(\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7)$, $252(\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7 - \text{H})$, $250(\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4)$, $249(\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5)$, $196(\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{CH}_3) = \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH})$] が一致した。

以上の分析結果から, TLC-画分の Fr. 6 と 7 から単離した油状物質は, ジテルペン的一种, フィトールであ

Fig. 3. Infrared Spectra of Isolated and Authentic Phytols (film).

— isolated phytol, ---- authentic phytol.

ると同定した。

2. 腓リパーゼ活性に対するフィトールの促進作用の検討

(1) フィトールによる促進効果の経時的変化: まず, 単離したフィトールのリパーゼ活性に対する作用を前回⁽⁴⁾と同じ Table I の条件で, 反応時間を追いつながら, 残渣画分と比較して検討した。Fig. 5(a) に示すように, activator 無添加の対照に比べ, フィトールを加えた場合は, 時間とともに著明な促進効果が認められ, その程度は残渣よりもむしろ高かった。なお, 標品フィトールも同様の促進効果を示した。

(2) 各種基質濃度におけるフィトールの促進効果: 基質濃度を前回⁽⁴⁾と同様に変えてみると, Fig. 5(b) の

Fig. 4. Mass Spectrum of Isolated Phytol.

Fig. 5. Effect of Phytol on Lipase Activity.

(a) time course, (b) tested under various substrate concentrations. The reaction conditions, except for incubation time or substrate concentrations, were the same as shown in Table I.
 ○—○ +phytol (isolated, 1.0 mg), ●—● control (1.0 ml ether in place of activator), △---△ +residue (residual fraction).

Fig. 6. Effect of Phytol on Lipase Activity.

(a) tested under various enzyme concentrations, (b) effect of phytol concentrations.

The reaction conditions, except for enzyme concentrations or phytol concentrations, were the same as shown in Table I.

○—○ +phytol, ●—● control, △---△ +residue, ▲—▲ +unsaponifiable matter, □—□ +Fr. 6.

ように、フィトールは残渣と同様に、トリアセチンの水に対する溶解度 (0.5 ml/10 ml) までは次第に促進効果が増大し、それ以上ではともに減少した。この減少は、フィトールの方が顕著であった。

(3) 各酵素濃度における促進効果：酵素濃度を変えて、促進効果を検討した結果が Fig. 6(a) である。この場合も、フィトールは残渣よりも強い促進効果を示

した。

(4) リパーゼ活性におよぼすフィトール濃度の影響：前回⁽⁴⁾と同じ一定条件 (反応時間 90 分, 基質濃度 0.25 ml/10 ml, 酵素濃度 20 mg/10 ml) を用いて、フィトールの濃度変化による促進効果を調べた。この際、activator の対照として、これまでの残渣以外に不ケン化物および Fr. 6 画分 (フィトールの単離に用い

た出発物質) を同時に用いて比較した。その結果, Fig. 6(b) から明かなように, フィトールは濃度とともに活性を次第に促進し, 0.5 mg/10 ml 付近で飽和に達した。この飽和点での対照の活性に対する促進効果は, 残渣, 不ケン化物および Fr. 6 が約 2.4~2.9 倍であるのに対し, フィトールは約 3.7 倍であった。

3. 残渣より単離した他の activator の構造と活性についての検討

上記の結果から, 残渣より単離した新 activator の一つはフィトールであり, かつこの物質はリパーゼ活性に対し, 残渣よりも強い促進作用を示すことが判明したので, 次に残渣よりフィトール以外の activator の単離を試み, その二つについて, 構造と促進効果を検討した。

(1) 構造の検討: 二つの activator は, 先に実験方法 2-2) で述べた TLC-画分のうちの Fr. 3 から単離した A-3 (油状物質) と, Fr. 9 から単離した A-9 (結晶物質) である。まず A-3 は, Fig. 7(a) に示すように, TLC 上でフィトール (P) ときわめて似た形と色調の単一のスポット (2) (もちろん R_f を異にするが) を示した。また, 常温で同じ油状液体であり, さらにその

Fig. 7. Thin-layer Chromatograms of Isolated Activators.

(a) A-3; (b) A-9. Spots: 1, Fr. 3 (one of TLC-fractions); 2, A-3 isolated from Fr. 3; 3, Fr. 9 (one of TLC-fractions); 4, A-9 isolated from Fr. 9; P, phytol; F, fucosterol.

Solvents: (a), hexane-EtOAc (9:1); (b), hexane-EtOAc (1:1). Detection of spots: (a), 25% SbCl_5 ; (b), conc. H_2SO_4 .

IR は, OH 基を示すピークが認められないほかは, ほぼフィトールと似たスペクトル [$\nu_{\text{max}}^{\text{film}}$: 2900 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$), 1662 cm^{-1} ($>\text{C}=\text{CH}$), 1465 cm^{-1} ($-\text{CH}_3$), 1380 cm^{-1}] を示した。以上から, A-3 はフィトールに類似した一種のテルペンと推定した。

次に A-9 の分析は, mp が 80~130°C と幅が広く, Fig. 7(b) の定性 TLC では, このもの (スポット 4) はフコステロール (F) とは異なる R_f 値と色調を示し, ほぼ単一に近い。Liebermann-Burchard 反応は陽性 (緑色, λ_{max} 620 nm)⁽⁵⁾ で, 反応が遅い^(6,7) ことから Δ^5 -ステロールと予想され, 一方ジキトニンと沈殿したことから, 3 β -OH のステロールであることが示唆された。このことは, さらに IR のスペクトル [$\nu_{\text{max}}^{\text{NaJol}}$: 3300 cm^{-1} (OH), 1710 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} (3 β -OH)^(8,9), 800 cm^{-1} と 840 cm^{-1} (Δ^5) から裏付けられた。ただし, このステロールには, フコステロールにみられた⁽²⁾ 820 cm^{-1} のピーク ($\Delta^{24(28)}$)^(10,11) はなく, 代りに 1710 cm^{-1} ($>\text{C}=\text{O}$ と思われる) のピークが認められた。

(2) リパーゼ活性に対する A-3 と A-9 の促進効果: 上記のようにして精製した二つの activator (A-3, A-9) の活性について, 2-(4) と同じ条件で, activator 濃度を変えて検討した。その結果, Fig. 8 から明らかなように, 対照の活性に対する促進効果 (mg activator 当り) は, 精製前の Fr. 3 および残渣がともに約

Fig. 8. Activating Effects of A-3 and A-9 on Lipase Activity.

Reaction conditions, except for activator concentrations, were the same as shown in Table I.

$\triangle-\triangle$ + A-3, $\blacktriangle-\blacktriangle$ + Fr. 3, $\odot-\odot$ + A-9, $\times-\times$ + Fr. 9, $\bigcirc-\bigcirc$ + phytol, $\square-\square$ + residue, $\blacksquare-\blacksquare$ + fucosterol, $\bullet-\bullet$ control.

3.0 倍であるのに対し, A-3 は約 4.0 倍と高く, フィトールのそれと同じ値を示した。一方, 精製した A-9 のステロールの活性は, 精製前の Fr.9 よりわずかに低下した。しかし, 先に単離した⁽²⁾フコステロールよりは, かなりの促進能を有していた。

4. リパーゼ活性におよぼす海藻以外の他のテルペン類の影響

これまでの結果から, 残渣中の促進物質の主体は, フィトールおよび A-3 のようなテルペンであることが判明したので, これに関連して海藻以外の植物に存在する他の二, 三のテルペン類について, その作用を検討した。すなわち, モノテルペン (C_{10}) としてネロール, セスキテルペン (C_{15}) としてファルネソール, およびテトラテルペン (C_{40}) として β -カロチンをそれぞれ activator として用いて, ジテルペン (C_{20}) のフィトールと効果を比較した。

その結果, Fig. 9 に示すように, フィトールの効果が最高であり, またファルネソールはフィトールとほぼ同じ促進効果を示したが, ネロールおよび β -カロチンはそれよりもはるかに低く, その値はフィトールの効果の約 1/3 以下であった。すなわち, 鎖長により促進効果に明瞭な差があることが認められた。一方, フィトールと同様なイソブレン鎖を側鎖にもつ α -トコフェロールは, フィトールに比べ, ごくわずかの促進作用しか示さな

Fig. 9. Activating Effects of Some Terpenes from Different Sources on Lipase Activity.

Reaction conditions, except for activator concentrations, were the same as shown in Table I.

●—● + farnesol (C_{15}), Δ — Δ + β -carotene (C_{40}), $\square$ — $\square$ + nerol (C_{10}), $\circ$ — $\circ$ + phytol (C_{20}), $\times$ — $\times$ + α -tocopherol; ●---● control.

った。

考 察

すでに前報⁽⁴⁾において, ヒジキ不ケン化物中の腓リパーゼ activator の主体は, フコステロール抽出の残渣画分にあることが明らかとなったので, 今回はさらに, この残渣から activator を精製・単離し, その構造と促進作用について検討した。

その結果, 本報告で述べたように, 残渣中の activator の主成分として単離した油状物質は, ジテルペンに属するフィトールであることが種々の分析結果より明らかとなった。なお, フィトールの海藻からの単離については, 最近報告⁽¹²⁻¹⁴⁾がみられるようになったが, ヒジキでは本報告が初めてである。——単離したフィトールと標品フィトールは, とくに TLC 上できわめて特徴的な形と色調のスポットを示し, この定性 TLC からだけでも充分同定できるほどであった (Fig. 2)。IR と MS も標品フィトールと全く同一であり, かつこれらは de Souza らの報告⁽¹²⁾したスペクトルとも良く一致した (Fig. 3 と 4)。

このように, 残渣より単離した新促進物質の一つはフィトールであることが明らかとなったので, 次にこのフィトールのリパーゼ活性に対する促進作用を改めて詳細に検討した。その結果, フィトールは残渣よりも強い促進作用を示すことが, 種々の条件における検討で判明した。すなわち, 経時の変化をみた場合 (Fig. 5(a)), 基質濃度を変えて検討した場合 (Fig. 5(b)), 酵素濃度を変えた場合 (Fig. 6(a)), さらにフィトールの濃度の影響をみた場合 (Fig. 6(b)) のいずれにおいても, 対照の活性に対しフィトールは著明な促進を示し, その効果は残渣, 不ケン化物および Fr.6 よりも明らかに高かった。ただ, 基質の濃度変化において, トリアセチンが水に不溶になる濃度 (0.6 ml/10 ml) 以上では, フィトールの効果の方が残渣のそれよりも, より顕著に減少した (Fig. 5(b))。この差の理由については目下推測の域を出ないが, 残渣中にはトリアセチンの水に対する溶解度を高める物質が存在する可能性も一つ考えられる。

いずれにせよ, これまでのトリアセチンを基質としたリパーゼ活性に対する不ケン化物の著明な促進作用⁽⁴⁾については, このフィトールで少なくとも量的には完全に説明することが可能となった。なお, フィトールにこのような腓リパーゼ activator 作用のあることを明らかに

したのは、本報告が最初である。

さらに、フィトール以外の activator の成分として、A-3 と A-9 の二つの物質を単離し、前者を OH 基をもたない一種のテルペン、後者をフコステロールとは構造を異にする（すなわち、フコステロールの側鎖にみられる⁽²⁾ような三置換二重結合^(10,11)をもたない）3 β -OH の Δ^5 -ステロールと、それぞれ推定した（Fig. 7(a) と 7(b)）。この両 activator の詳細な構造については、検討中である。また、このうち活性は A-3 の方が A-9 よりもかなり強く、その程度はフィトールとはほとんど同じであった（Fig. 8）。

このように、OH 基を有するフィトールと OH 基を有しない A-3 のテルペンとの間に、活性に全く差が認められなかったことから、この種 activator の作用は OH 基の有無には無関係と考えられる。逆に、前回⁽²⁾のフコステロールを含め、これら activator の構造に共通の点は、イソブレン骨格をもつことである。従って、このようなテルペンとステロール系の物質が、酵素（腓リパーゼ）と基質（トリアセチン）の親和性あるいは反応性を高めるのに必要なものと思われる。

最後に、今回単離したフィトールの作用と比較するために用いた他のテルペン類（ β -カロチン、ファルネソール、ネロール）の中では、ファルネソールが最も強い促進効果を示し、その程度はフィトールとほぼ同じであった（Fig. 9）。このように、テルペンの種類により、促進効果に明確な差が認められたことから、この種の activator の作用には最適の「鎖長」、すなわちイソブレン単位数（おそらく、今回のフィトールやファルネソールのように 3~4 個）が存在するものと推定される。またフィトールと類似したイソブレン骨格を側鎖にもつ α -トコフェロールの効果は、フィトールよりもはるかに低かった（Fig. 9）。この場合の促進効果の差は、両者の構造の差異、すなわちクロマン核の有無と関係があるものと考えられる。

以上、フィトールを含めたこのような activator の作用機構については、最近、ある種の脂質がリパーゼの活性発現に関与することが知られてきた⁽¹⁵⁻²¹⁾ので、この面とも関連させて検討する必要がある問題と思う。

また、このように活性の強い、構造の明らかな、しかも一群の activator の典型とみなしうるフィトールが手に入ったので、これを用いれば今後、activator の作用の対象がいわゆる「エステラーゼ」なのか「リパーゼ」

かを明らかにすることができよう⁽²²⁾。

要 約

ヒジキ不ケン化物中の activator の本体をより明らかにするため、そのフコステロール抽出残渣の TLC-画分から activator の主成分を二、三単離し、それらの構造とリパーゼ活性に対する促進効果について検討した。

(1) 残渣より単離した新 activator の一つは、ジテルペンの一種フィトールであることを種々の機器分析等により明らかにした。ヒジキからの本物質の単離の報告は、これが最初である。

(2) 単離したフィトールは、トリアセチンを基質としたリパーゼ活性に対し、不ケン化物または残渣よりも強い促進効果を示すことを明らかにした。このフィトールのリパーゼ活性促進作用については、本報が初めてである。

(3) 他に、残渣より activator の成分として A-3 と A-9 を単離し、それぞれ OH 基を有しない一種のテルペン、およびフコステロールとは構造を異にするステロールであると推定した。このうち、A-3 はフィトールにほぼ匹敵する促進作用を示した。

(4) 比較に用いた他のテルペン類の中では、ファルネソール (C_{15}) がフィトール (C_{20}) とほぼ同程度の最も強い促進効果を示し、ネロール (C_{10})、 β -カロチン (C_{40}) は、はるかに弱かった。なお、 α -トコフェロールの効果は、きわめて低かった。

終りにのぞみ、IR および MS の分析にご協力いただいた東北大学農学部梅津憲治氏に謝意を表します。

本報告の一部は昭和 48 年 4 月 2 日、日本農芸化学学会大会（東京）において講演した。

なお、本研究の費用の一部は昭和 48 年度科学研究費補助金による。

- (1) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **45**, 337 (1971).
- (2) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **47**, 293 (1973).
- (3) T. Komura, H. Nagayama and S. Wada: 9th Int. Cong. Biochem., Stockholm, Abst. Book, p. 402 (1973).
- (4) 小村 毅, 長山英男, 和田せつ: 農化, **47**, 813 (1973).
- (5) P. R. Moore and C. A. Baumann: *J. Biol. Chem.*, **195**, 615 (1952).

- (6) R. P. Cook : *Analyst*, **86**, 373 (1961).
(7) 小野輝夫 : 生化学, **38**, 283 (1966).
(8) A. R. H. Cole, R. N. Jones and K. Dobriner :
J. Am. Chem. Soc., **74**, 5571 (1952).
(9) R. N. Jones and G. Roberts : *ibid.*, **80**, 6121
(1958).
(10) J. P. Dusza : *J. Org. Chem.*, **25**, 93 (1960).
(11) G. F. Gibbons, L. J. Goad and T. W. Goodwin :
Phytochemistry, **7**, 983 (1968).
(12) N. J. de Souza and W. R. Nes : *ibid.*, **8**, 819
(1969).
(13) 竹本常松, 竹下保義 : 薬誌, **90**, 1057 (1970).
(14) N. Ikekawa, M. Morisaki and K. Hirayama :
Phytochemistry, **11**, 2317 (1972).
(15) R. L. Ory, R. H. Barker and G. J. Boudreaux :
Biochemistry, **3**, 2013 (1964).
(16) H. Okuda and S. Fujii : *J. Biochem.*, **64**, 377
(1968).
(17) 藤井節郎 : 生化学, **43**, 1022 (1971).
(18) 野田万次郎 : 化学と生物, **7**, 590 (1969).
(19) 辻阪好夫 : 同上, **8**, 315 (1970).
(20) M. Iwai, Y. Tsujisaka, Y. Okamoto and J.
Fukumoto : *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 929 (1973).
(21) Y. Ota, K. Yoshioka, Y. Minoda and K.
Yamada : *ibid.*, **37**, 2879 (1973).
(22) 小村 毅, 和田せつ, 長山英男 : 生化学, **45**,
752 (1973).
-