報 文

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 66, No. 12, pp. 1757~1764, 1992]

うずら卵白オボインヒビターの精製と性質

高橋享子, 浅尾俊夫, 鈴木喜子,

田代 操*, 金森正雄

(武庫川女子大学家政学部, *京都府立大学生活科学部)

平成 4 年 3 月 13 日 受 理

Purification and Characterization of Ovoinhibitor from
Japanese Quail Egg WhiteKyoko TAKAHASHI, Toshio ASAO, Nobuko SUZUKI, Misao TASHIRO*,
and Masao KANAMORI*Department of Food Sciences, Faculty of Home Economics,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, Hyogo 663*** Kyoto Prefectural University, Sakyo-ku, Kyoto 606*

Ovoinhibitor was purified from Japanese quail egg whites to an electrophoretically homogeneous protein by alcohol fractionation, column chromatography on Sephadex G-75 and DEAE-Sephacel CL-6B, isoelectrofocusing, and high-pressure liquid chromatography. Purified ovoinhibitor had a molecular weight of 53,000 and a pI of 6.9. The carbohydrate content of the inhibitor was 1.6% by the phenol-sulfuric acid method. The inhibitor contained many aspartic acid residues and few methionine or phenylalanine residues. This ovoinhibitor inhibited bovine trypsin, bovine chymotrypsin, subtilisin, and porcine elastase. The inhibitor was stable in a wide pH range and was heat-resistant when the pH was acidic. Japanese quail ovoinhibitor resisted proteolysis by pepsin.

(Received March 13, 1992)

緒 言

タンパク質分解酵素を特異的に阻害するタンパク質、いわゆるプロテアーゼインヒビターは、動植物の組織中や微生物界に広く存在している。複雑な生命現象のなかで、組織におけるそれらの作用機構および存在意義など生理生化学的な研究は、最近、生体制御という観点から非常に興味のある分野となっており、数多くの研究が進められている。また、一般にトリプシンやキモトリプシンに対するプロテアーゼインヒビターは抗栄養因子の1つとみなされ、それを摂取した動物に生育抑制や肝臓肥大をもたらすことから栄養学的、食品学的にも注目を集めている。

タンパク質分解酵素は、セリン酵素、チオール酵素、

カルボキシル酵素、メタル酵素の4種に分類できる。プロテアーゼインヒビターはこれらすべての酵素にそれぞれ対応して存在しているが、それらのなかで圧倒的に研究されているのはセリン酵素に対応するインヒビターである。とくにマメ科植物種子中に存在する Bowman-Birk 型インヒビターや鳥類卵白中のオボムコイドなどはその代表的なものである。

ところで、鳥類卵白中にはオボムコイド以外にオボインヒビターと呼ばれる別のタイプのプロテアーゼインヒビターの存在することが知られている。しかしながら、このオボインヒビターに関しては、ニワトリオボインヒビターの報告⁽¹⁻³⁾がほとんどで他の鳥類のオボインヒビターに関してはあまり報告がされていない。今回、われわれは日本うずらオボインヒビターの精製および特性に

ついて検討したのでその結果を報告する。

実験材料および方法

1. 供試料 市販うずら卵の卵黄と卵白を分離し、卵白液をイオン交換水で5倍希釈後、均一溶液にしたものを出発材料とした。

2. 酵素および阻害活性測定法 トリプシン活性の測定には、酵素としてウシ膵臓トリプシン (Sigma 社製, Type III), 基質として合成基質 BAPA (Benzoyl-D, L-arginine-*p*-nitroanilide) を用い比色法で行った。すなわち, 0.01 M CaCl_2 を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 2.2 ml に酵素溶液 0.1 ml を加え, さらに 0.1 ml の合成基質を添加し反応を開始した。37°C, 10 分間の反応後, 1.0 ml の 10% 酢酸を加え反応を止め 410 nm での吸光度を測定した。酵素活性は, 酵素を作用させる前に反応を止めたもの (盲検) と酵素を作用させたものとの吸光度の差で表した。なお, トリプシンは 0.005 M CaCl_2 を含む 0.005 M HCl 溶液に溶解し, 酵素濃度は吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) = 15.4⁽⁴⁾ から算出した。合成基質 BAPA は 10 mg を 1 ml の dimethylsulfoxide に溶解したものを保存基質溶液とした。トリプシン阻害活性は, トリプシンとインヒビターをあらかじめ 2 分間ブレインキュベーションした後, 合成基質を加えて測定した残余酵素活性から評価した。

キモトリプシン活性の測定には, 酵素としてウシ膵臓キモトリプシン (Sigma 社製, Type II), 基質として合成基質 BTPA (Benzoyl-L-tyrosine-*p*-nitroanilide) を用い比色法で行った。すなわち, 先述の Tris 緩衝液 1.7 ml に酵素溶液 0.1 ml を加え, さらに 0.2 ml の基質を添加し反応を開始した。37°C, 10 分間の反応後, 1.0 ml の 10% 酢酸を加えて反応を止め 410 nm での吸光度を測定した。なお, 酵素濃度は, 吸光係数 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (280 nm) = 20.5⁽⁴⁾ から算出した。また, 合成基質 BTAP は, 1.22 mg を 1 ml の dimethylformamide に溶解したものを保存基質とした。キモトリプシン阻害活性は, トリプシン阻害活性と同様にして評価した。

3. 電気泳動分析および分子量測定 SDS-PAGE は Laemmli の方法⁽⁵⁾に従い pH 8.8, 4~20% アクリルアミドグラジエントスラブゲルを用いて行った。うずら卵白オボインヒビター (OIJPQ) の分子量は SDS-PAGE により求めた。標準タンパク質として, 低分子量測定キット (Phosphorylase b, MW 94,000; Bovine se-

rum albumin, MW 67,000; Ovalbumin, MW 43,000; Carbonic anhydrase, MW 30,000; Soybean trypsin inhibitor, MW 20,100; α -Lactalbumin, MW 14,400; Pharmacia 社製) を用いた。

4. 糖の定量 OIJPQ の糖含量は, フェノール硫酸法⁽⁶⁾に基づいて測定した。

5. アミノ酸組成分析 OIJPQ を 6N HCl に溶解し脱気封管後, 110°C, 24 時間加水分解した。加水分解物の分析は Spackman らの方法⁽⁷⁾に準じ日立 835 型アミノ酸自動分析機および Sic インテグレーター 7000 A 型を用いて行った。

6. アミノ酸配列分析 N末端アミノ酸配列分析は, Applied Biosystems 477/120 A 型プロテインシーケンサーを用いて行った。

7. pH 安定性 緩衝液として pH 2 は 0.05 M クエン酸ナトリウム-塩酸を, pH 4 は 0.05 M 酢酸ナトリウム-酢酸を, pH 6 と 8 は 0.05 M リン酸 2 ナトリウム-リン酸 1 ナトリウムを, pH 10 は 0.05 M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウムを, pH 12 は 0.05 M リン酸 2 ナトリウム-水酸化ナトリウムを用いた。おのおのの緩衝液 0.19 ml に精製インヒビター 0.01 ml を加え, 37°C で 24 時間インキュベーションした。反応時間終了後, それぞれの反応液に 0.02 M CaCl_2 を含む 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8) を 2.0 ml, トリプシン溶液 0.1 ml, さらに BAPA 基質溶液 0.1 ml を加えて残存トリプシン阻害活性を測定した。

8. 熱安定性 おおのこの試験管にそれぞれ pH 2, 7 および 10 の緩衝液 0.28 ml と精製インヒビター 0.02 ml を加え重量を測定した。沸騰浴中にて 5, 10, 20, 30 分間加熱し, 時間経過後急速に冷却した。つづいて水を加えて重量補正を行った後, 各試験管に前述の 0.2 M Tris 緩衝液 (pH 8) 2.0 ml, トリプシン溶液 0.1 ml, BAPA 基質溶液 0.1 ml を加え残存トリプシン阻害活性を測定した。

9. ペプシン消化 精製インヒビターに対してペプシン消化を行った場合の阻害活性変化について検討した。ブタのペプシン (Sigma 社, 2×crystallized) 10 μg を 0.1N HCl 1.24 ml に溶解し, それに精製インヒビター溶液 (1 mg/ml) 0.25 ml を加え, 37°C でインキュベーションした。0, 0.5, 1, 2, 3, 24 時間後, 反応液を 0.2 ml 分取し, これに 0.1 M Tris 緩衝液 2.0 ml を加え, 先と同様にして残存トリプシン阻害活性を測定し

た。

10. 他のプロテアーゼに対する阻害作用 精製インヒビターのサブチリシン (Sigma 社製, Type VIII) およびブタ膵臓エラスターゼ (Sigma 社製, Type IV) に対する阻害作用について、基質として合成基質 Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-*p*-nitroanilide を用いて検討した。なお、サブチリシンとエラスターゼは 0.005 M CaCl_2 を含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、それらの酵素濃度は、それぞれ $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280 nm) = 9.6⁽⁴⁾, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (280 nm) = 20.2⁽⁴⁾ を使用して計算した。なお、基質はサブチリシンの場合 20 mg を、エラスターゼの場合は 10 mg を 1 ml の dimethylsulfoxide に溶解したものを使用した。阻害活性測定はトリプシンの場合と同様にして行った。

実験結果

1. うずら卵白オボインヒビター (OIJ PQ) の精製

うずら卵白 100 ml (20 個) に 4 倍量のイオン交換水を加え均一溶液にした後、低温下で冷エチルアルコールを終濃度 55% になるまで滴下した。一夜低温攪拌後、遠心分離 (16,000 × *g*, 60 分間) し上清を得た。上清部にさらに冷エチルアルコールを終濃度 68% になるまで滴下し冷却遠心分離 (25,500 × *g*, 60 分間) 後の沈澱物を得た。この沈澱物に水を加え溶解し、遠心分離により

不溶物を取り除いた後凍結乾燥し、粗インヒビター (512 mg) を得た。つづいて、この粗インヒビター 200 mg を 10 ml の 0.05 M NH_4HCO_3 溶液に溶解し、遠心分離後、上清を同じく 0.05 M NH_4HCO_3 溶液で平衡化した Sephadex G-75 カラム (3.5 × 90 cm) に添加しゲルクロマトグラフィーを行った。結果を Fig. 1 に示す。さらに、トリプシンとキモトリプシン両者を阻害する画分を集め、凍結乾燥し、これを 0.025 M Tris-HCl (緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、遠心分離後の上清を同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B カラム (2.5 × 25 cm) に添加しイオン交換クロマトグラフィーを行った。結果は Fig. 2 に示す。0.1 M から 0.5 M の食塩グラジエント溶出によりトリプシンおよびキモトリプシン阻害活性を有するタンパク質画分が得られ、これを脱塩した後、凍結乾燥した。本調製品は電気泳動分析の結果、未だ均一ではなかったため、さらに調製用焦点電気泳動にて精製を進めた。すなわち、インヒビター試料 20 mg を pH 3.5~10 の Carrier ampholyte (LKB 社) を含むショ糖グラジエント溶液 (110 ml) 中で 4°C, 48 時間, 1 W の定電力で電気泳動した。Fig. 3 に示すように、pH 6.9 の位置にトリプシンとキモトリプシンに対する阻害活性を有するタンパク質ピークが認められた。この画分を回収し、Sephadex G-75 を用いるゲルクロマトグラフィーにより試薬を除去した後、さらに逆相カラム

Fig. 1. Gel-chromatography of the Crude Ovoinhibitor Obtained by 55~68% Ethanol Fractionation of Japanese Quail Egg White. ●, absorbance at 280nm; ○, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity. The sample solution (10 ml) containing 200 mg of the crude ovoinhibitor was applied to a column (3.5 × 90 cm) of Sephadex G-75 equilibrated with 0.05 M NH_4HCO_3 and was eluted with the same solution at a flow rate of 30 ml/hr.

Fig. 2. Ion-exchange Chromatography of the Inhibitor Separated by the Sephadex G-75 Gel-chromatography. ●, absorbance at 280 nm; ◐, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, NaCl concentration. The sample was applied to a column (2.5×25cm) of DEAE-Sepharose CL-6B equilibrated with 0.025 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). After washing the column with the buffer, the protein was eluted with a linear gradient of NaCl (0.1~0.5 M in the same buffer) at a flow rate of 30 ml/hr.

Fig. 3. Isoelectric Focusing of the Inhibitor Obtained by the DEAE-Sepharose CL-6B Ion-exchange Chromatography. ●, absorbance at 280 nm; ◐, trypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity; ---, pH. The inhibitor sample (20 mg) was subjected to electrophoresis in a sucrose density gradient solution (110 ml) containing a carrier ampholyte (pH 3.5~10) at 4°C for 48 hr with 1 W of electric power.

(Chemcosorb 300-7 C 8) を用いる HPLC にて精製を行った。オボインヒビターは単一タンパク質ピークとして溶出し、これを凍結乾燥して最終精製品とした。

2. 電気泳動分析と分子量測定

最終精製品の均一性確認と OIJPQ の分子量測定のため SDS-PAGE を行った。その結果、Fig. 4 に示すように OIJPQ の単一バンドが確認され均一標品であること

が認められた。また、標準タンパク質の移動度との比較より本オボインヒビターの分子量を 53,000 と推定した。なお、比較として用いたニワトリオボインヒビターの分子量は 50,000 であった。

3. トリプシンおよびキモトリプシン阻害活性

精製 OIJPQ のトリプシンとキモトリプシンに対する阻害活性を測定した結果を Fig. 5 に示す。本インヒビ

Fig. 4. SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis of Ovo-inhibitors from Japanese Quail and Chicken. A, purified ovo-inhibitor from Japanese quail ($10\mu\text{g}$); B, ovo-inhibitor from chicken ($50\mu\text{g}$). Marker proteins used were: 1, phosphorylase b (MW 94,000); 2, bovine serum albumin (MW 67,000); 3, ovalbumin (MW 43,000); 4, carbonic anhydrase (MW 30,000); 5, soybean trypsin inhibitor (MW 20,100); 6, α -lactalbumin (MW 14,400).

ターはトリプシンよりもキモトリプシンに対してより強い阻害を示した。完全阻害の外挿値より、インヒビター/酵素の重量比を求めると、トリプシンでは 1.4, キモトリプシンでは 0.7 となった。

4. 糖含量, アミノ酸組成, N末端アミノ酸配列

フェノール硫酸法で求めた OIJPQ の糖含量は, グル

Table I. Amino Acid Composition of Ovo-inhibitor from Japanese Quail Egg White

Amino acid	mol (%)
Aspartic acid	12.95
Threonine	5.91
Serine	5.18
Glutamic acid	9.63
Proline	5.01
Glycine	8.23
Alanine	4.46
Half-cystine	8.39
Valine	6.38
Methionine	2.04
Isoleucine	4.93
Leucine	5.02
Tyrosine	4.16
Phenylalanine	1.28
Lysine	7.20
Histidine	4.51
Arginine	4.72
Total	100.0

コース標準曲線より 1.6% であった。

OIJPQ のアミノ酸組成は Table I に示すように Asp が最も多く, また Glu, Cys, Lys も比較的多く存在していた。一方, Met や Phe はモル割合が少なかった。

N末端アミノ酸配列については, 加藤らの報告⁽⁶⁾によるものと 30 残基まで一致した。また, Fig.6 は Scott

Fig. 5. Inhibitory Activities of Japanese Quail Ovo-inhibitor against Trypsin and Chymotrypsin. A, [Bovine trypsin] = $2.46 \times 10^{-7}\text{M}$; B, [Bovine chymotrypsin] = $3.77 \times 10^{-7}\text{M}$. A constant amount of trypsin or chymotrypsin was incubated with various amounts of the inhibitor for 2 min at pH 8 and the residual enzyme activity in each mixture was measured for 10 min at 37°C with an enzyme substrate.

	1														15
OIJPQ	I	E	V	D	C	S	Q	Y	S	S	G	I	S	K	D
OICHI	I	E	V	D	C	S	L	Y	A	S	G	I	G	K	D
	16														30
OIJPQ	G	T	S	W	V	A	C	P	R	N	L	K	P	V	C
OICHI	G	T	S	W	V	A	C	P	R	N	L	K	P	V	C

Fig. 6. Comparison of the N-terminal Sequences of Ovoidinhibitors from Japanese Quail (OIJPQ) and Chicken (OICHI). The sequence of OICHI was derived from its cDNA⁽⁹⁾.

らの報告⁽⁹⁾によるニワトリオボインヒビター cDNA からのアミノ酸配列と OIJPQ の N 末端配列を比較したものである。30 残基までであるが、7, 9, 13 番目のアミノ酸が違っているのみであった。

5. 安定性

pH 安定性に関しては Fig. 7 A に示すように、pH 2～8 では 37°C, 24 時間のインキュベーションによっても OIJPQ の阻害活性はほとんど変化がなく安定であったが、pH 10 以上では不安定であった。

Fig. 7 B は OIJPQ の熱安定性を示している。pH 2 の酸性域では、100°C, 30 分処理後も残存阻害活性が 50% と OIJPQ は比較的熱に対し安定であった。しかし、pH 10 のアルカリ域では 5 分処理で完全に失活した。

OIJPQ はまたペプシン消化に対しても安定であった。すなわち、24 時間のペプシン消化によっても元の約 80% の阻害活性を残していた。

Fig. 7. Stability of Japanese Quail Ovoidinhibitor. A, stability at various pH values. After the inhibitor solution had been incubated at various pHs for 24 hr at 37°C, the remaining trypsin inhibitory activity of each incubation mixture was measured at pH 8.0. B, stability against heat. The inhibitor was heated at 100°C in buffers of pH 2, 7 and 10. ○, 50mM Na-citrate-HCl (pH 2); □, 50mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH 7); △, 50mM Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 10).

6. 他のプロテアーゼに対する阻害作用

Fig. 8 に示すように OIJPQ はサブチリシンやエラスターゼに対しても阻害能力を有していた。それぞれの酵素に対する阻害対応をインヒビター/酵素の重量比で表すと、サブチリシンに対して 1.2, エラスターゼに対し

Fig. 8. Inhibitory Activities of Japanese Quail Ovoidinhibitor against Subtilisin and Elastase. A, $[\text{Subtilisin}] = 1.11 \times 10^{-7} \text{M}$; B, $[\text{Porcine elastase}] = 1.46 \times 10^{-7} \text{M}$. The assay procedure was the same as that in Fig. 5.

て 0.9 であった。

考 察

ニワトリ卵白よりオボインヒビターの分離精製については Lineweaver and Murray⁽¹⁰⁾, Matsushima⁽¹¹⁾, Rhodes ら⁽¹²⁾, Tomimatsu ら⁽¹³⁾, Davis ら⁽¹⁴⁾の方法が報告されているが、うずら卵白からのオボインヒビターの精製については加藤らの予備的報告⁽⁶⁾があるのみである。今回、われわれはアルコールによるステップワイズ分画法によりうずら卵白 100 ml 当り約 500 mg の粗オボインヒビターを得、さらに各種クロマトグラフィー、焦点電気泳動、HPLC により均一オボインヒビターを 10 mg 回収することができた。

うずら卵白オボインヒビターはトリプシンやキモトリプシンのみならずサブチリシンやエラスターゼに対しても阻害活性を有していた。また、本インヒビターの分子量を 53,000、酵素の活性純度をすべて 80% と仮定すると、1モルの OIJPQ はトリプシン 1.4 モル、キモトリプシン 2.4 モル、サブチリシン 1.3 モル、エラスターゼ 1.9 モルを阻害できる計算になる。このことより本インヒビターは、多種の酵素を阻害できるという点で、多機能なインヒビターであり、かつ、キモトリプシンやエラスターゼに対しては1モルのインヒビターで少なくとも2モルの酵素を阻害できることから、これらの酵素に対する阻害反応部位を少なくとも二ヶ所有する多頭性のインヒビターであるといえる。

N末端アミノ酸配列は加藤らの報告⁽⁶⁾にみられる配列と一致した。したがって、本法で得られたオボインヒビターは、加藤らの調製品と少なくともタンパク質部分については同一のものであるといえよう。また、Scott ら⁽⁹⁾によるニワトリオボインヒビターの全アミノ酸配列は cDNA より推定して報告されているが、本インヒビターと比較すると 30 残基までのうち 7, 9, 13 番目のアミノ酸残基が異なるのみでその他はすべて同一であった。このことより、うずらオボインヒビターはニワトリオボインヒビターと相同性の高いインヒビターであると考えられる。なお、ニワトリオボインヒビターは7つの直列なドメインよりなり、そのうち1～4ドメインは潜在的トリプシン阻害型、5～7ドメインが潜在的キモトリプシン阻害型と報告されている。おそらく、うずらオボインヒビターも同様の構造をとっているものと思われる。

本インヒビターは、マメ科植物種子中に広く存在する Bowman-Birk 型インヒビター⁽¹⁵⁾やニワトリ卵白オボムコイド⁽¹⁶⁾などと同様に、広い pH 域で安定であり、また酸性で比較的強い耐熱性を示した。さらに、ペプシン消化に対しても耐性であることが示された。オボインヒビターのこのような安定性は、調理後摂取された本インヒビターがある程度活性なままで消化管内に存在しうることを示すもので、栄養学および食品学的にも興味ある問題となろう。

要 約

うずら卵白より、アルコールによるステップワイズ分画法、Sephadex G-75 ゲルクロマトグラフィー、DEAE-Sephrose CL-6B イオン交換クロマトグラフィー、焦点電気泳動、さらに逆相 HPLC にて均一なオボインヒビターを調製した。本インヒビターの糖含量は 1.6%, pI は 6.9, 分子量は 53,000 で、N末端アミノ酸は Ile であった。うずらオボインヒビターは pH 2～8 で安定であり、とくに酸性で強い耐熱性を示した。また、ペプシン消化に対しても抵抗性を示した。本インヒビターはウシトリプシンやウシキモトリプシンに対してのみならず、ブタエラスターゼや微生物由来のサブチリシンに対しても強い阻害作用を示した。

- (1) G. Feinstein : *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 74—77 (1971).
- (2) J. C. Zahnley : *J. Biol. Chem.*, **250**, 7879—7884 (1975).
- (3) A. Gertler and I. Ben-Vald : *Eur. J. Biochem.*, **110**, 571—577 (1980).
- (4) 日本生化学会編 : 「生化学データブック (I)」東京化学同人, 1979, pp. 91—115.
- (5) U. K. Laemmli : *Nature*, **227**, 680—685 (1970).
- (6) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith : *Anal. Chem.*, **28**, 350—356 (1956).
- (7) D. H. Spackman, W. H. Stein, and S. Moore : *Anal. Chem.*, **30**, 1190—1206 (1958).
- (8) 加藤郁之進, W. J. Kohr, M. Laskowski, Jr. : タンパク質構造討論会予稿集, **29**, 13—16 (1978).
- (9) M. J. Scott, C. S. Huckaby, I. Kato, W. J. Kohr, M. Laskowski, Jr., M.-J. Tsai, and B. W. O'Malley : *J. Biol. Chem.*, **262**, 5899—5907 (1987).
- (10) H. Lineweaver and C. W. Murray : *J. Biol. Chem.*, **171**, 565—581 (1947).

- (11) K. Matsushima : *Science*, **127**, 1178—1179 (1958).
 - (12) M. B. Rhodes, N. Bennett, and R. E. Fee-
ney : *J. Biol. Chem.*, **235**, 1686—1693
(1960).
 - (13) Y. Tomimatsu, J. J. Clary, and J. J. Bartu-
lovich : *Arch. Biochem. Biophys.*, **115**,
536—544 (1966).
 - (14) J. G. Davis, J. C. Zahnley, and J. W. Dono-
van : *Biochemistry*, **8**, 2044—2053 (1969).
 - (15) T. Ikenaka and S. Norioka : in "Proteinase
Inhibitors," ed. by A. J. Barrett and G.
Salvesen, Elsevier, Amsterdam, 1986, pp.
361—374.
-