大豆プロテイナーゼインヒビターに関する研究

(第1報) アセトン不溶インヒビターの精製と性質

間宮米二*・戸塚耕二*・庄司圭吾*・麻生和衛*

Studies on Soybean Proteinase Inhibitors

Part I. Purification and some properties of acetone insoluble inhibitor

YONEJI MAMIYA, KOJI TOTSUKA, KEIGO SHOJI and KAZUE Aso

Six trypsin inhibitors (F_1 , F_2 , F_3 -I, F_3 -II, F_4 and F_6) and three α -chymotrypsin inhibitors (F_3 -II, F_4 and F_6) were fractionated from crude soybean acetone insoluble inhibitor by gel filtration with Sephadex G-100 and DEAE-Sephadex A-25 chromatography.

The F_4 inhibitor was found to be homogeneous by electrophoretic and ultracentrifugic analyses, and strongly inhibited both trypsin and α -chymotrypsin, and had separate binding sites for trypsin and α -chymotrypsin, and was stable at temperature in an acidic pH. Molecular weight and sedimentation constant of the F_4 inhibitor were determined to be 8000 and 1.85, respectively. NH_2 - and $COOH$ -terminal amino acids of the F_4 inhibitor were aspartic acid and glutamic acid-asparagine, respectively. The reaction between trypsin and the F_4 inhibitor consisted in formation of a dissociable complex.

The chemical and physicochemical properties of the F_4 inhibitor were in good agreement with those of Bowman-Birk inhibitor and 1.9S inhibitor.

(Received Apr. 12, 1972)

大豆タンパク質は、食品および飼料的利用価値の高いタンパク質であるが、ウレアーゼ、ヘマグルチニン、プロテイナーゼインヒビターといった有害物質を含んでいる。大豆プロテイナーゼインヒビターは、現在、数種類分離されているが¹⁻⁵⁾、BOWMAN⁶⁾ がみいだした、60%アルコールに可溶で、アセトンに不溶なインヒビター(アセトン不溶インヒビター)については、BIRK⁷⁾ および FRATTALI⁷⁾ によって精製され、それぞれ、purified inhibitor AA, Bowman-Birk (B-B) inhibitor と名づけられ、諸性質が報告されている。また、大豆プロテイナーゼインヒビターは、生大豆を雛やラットのタンパク質源として用いたときに、成長阻害や脾臓肥大を起こす、栄養阻害作用との関係について研究されているが⁸⁻¹⁰⁾、まだ、明確な結論をうるにはいたっていない。

著者らは、大豆タンパク質の食品および飼料的利用にさいして、タンパク効果を減ずると考えられるプロテイナーゼインヒビターのうちで、アセトン不溶インヒビ

ターについて、タンパク質化学的、酵素化学的および栄養化学的性質を調べるために、脱脂大豆の60%エタノール抽出液をアセトンで沈殿させたものについて、Sephadex G-100 ゲル濾過および DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーで分離を行ない、 F_1 , F_2 , F_3 -I, F_3 -II, F_4 および F_6 の6種のインヒビター画分をえ、トリプシンおよび α -キモトリプシン阻害活性の高い F_4 画分について、諸性質を調べたので報告する。

実験材料および方法

1. 試料および試薬

脱脂大豆は日清製油株式会社製のソーヤフラワー A (大豆を圧片、*n*-ヘキサンで油を抽出後、50~60°Cで30~40分脱溶剤し、微粉碎したものである)、カゼイン(Hammarsten)は、E. Merk AG 製、トリプシン(2回結晶、50% $MgSO_4$ 含有)、 α -キモトリプシン(3回結晶)、結晶大豆トリプシンインヒビター(以下、Kunitz-

* 日本農産工業株式会社中央研究所(横浜市緑区台村町 1)

Research Center, Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd. Midori-ku, Yokohama.

STI) およびカルボキシペプチダーゼ A (2 回結晶, 水懸濁, 以下, CPA) は Worthington Biochemical Corp. 製, ペプシン (3 回結晶) は Nutritional Biochemicals Corp. 製, ウシアルブミンフラクション V は The Armour Laboratories 製, *p*-トシル-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩 (以下, TAME) およびベンゾイル-L-チロシンエチルエステル (以下, BTEE) は Mann Research Laboratories 製, Sephadex G-100 および DEAE-Sephadex A-25 は Pharmacia Fine Chemicals 製を使用した。

2. 酵素活性および酵素阻害活性の測定

トリプシンおよび α -キモトリプシンの活性は, KUNITZ のカゼイン消化法¹¹⁾の萩原ら¹²⁾による変法である, カゼイン-275 nm 吸収 B 法で, また, トリプシンについては, TAME を用いて 247 nm 差スペクトル法, α -キモトリプシンについては, BTEE を用いて 254 nm 差スペクトル法でも測定した¹³⁾。酵素阻害活性度 (I) は, 酵素とインヒビターを室温で反応させ, 酵素活性を測定し, インヒビターを反応させないときの酵素活性にたいして, パーセントで表わした。I (%) = $(U - U^*) \times 100 / U$ (U, 酵素活性度; U*, インヒビターの作用をうけたときの酵素活性度)。

3. インヒビターの抽出方法

脱脂大豆に 7 倍量の 60% エタノール (V/V) を加え, 室温で 1 時間攪拌後, 吸引濾過, 濾液に等量の -10°C アセトンを加え, 5°C に 15 時間放置後, 沈殿物を集めて凍結乾燥した。この粗製アセトン不溶インヒビターを精製に使用した。

4. 実験方法

タンパク質窒素量は, ミクロケルダール法で測定した。インヒビターの純度は, ポリアクリルアミドディスク電気泳動法¹⁴⁾, Hitachi Tiselius HT-B₂ 型を用いた移動界面法および超遠心分析によって行なった。分子量は, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いるポリアクリルアミドディスク電気泳動で, 分子量既知のタンパク質には, ペプシン, トリプシン, α -キモトリプシンおよびウシアルブミンフラクション V を用いて, WEBER ら¹⁵⁾の方法によって行なった。アミノ酸は, インヒビターを減圧封管中 6 N HCl で 110°C, 24, 48, 72 時間加水分解し, Technicon オートアナライザー (chromobeads type A resin, 60×0.6 cm カラム) で分析し, トリプトファンの定量は, EDELHOCH¹⁶⁾の方法で行なった。N 末端分析は DNP 法¹⁷⁾, C 末端分析は, native なものと過ギ酸酸化¹⁸⁾したものについてヒドラジン分解法¹⁹⁾

で, また, native なものと S-S 結合還元後カルボキシメチル化²⁰⁾したものについては, pH 8.5, 37°C, 基質対酵素モル比 10:1 で CPA 法²¹⁾で行ない, 遊離アミノ酸の分析は, Technicon オートアナライザーで, リチウム緩衝液を用いる方法²²⁾で行なった。

実験結果

1. アセトン不溶インヒビターの精製

(1) Sephadex G-100 ゲル濾過

粗製アセトン不溶インヒビター 15 g を脱イオン水 30 ml に溶解し, 遠心分離後, 上清を Sephadex G-100 (3.6×92 cm) カラムに添加し, 5°C で脱イオン水で溶出した。Fig. 1 に示すように 4 画分をえ, トリプシンインヒビターは 3 番目の画分に存在した。インヒビター画分は凍結乾燥した。

(2) DEAE-Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィー

Sephadex G-100 ゲル濾過でえたインヒビター 570 mg について, 混合槽に 0.05 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 5.0 (700 ml), 補給槽に 0.5 M AcONH₄ pH 5.0 (700 ml) を用いる gradient elution による, DEAE-Sephadex A-25 (2.5×50 cm) カラムクロマトグラフィーを 5°C で行ない, Fig. 2 に示すように, F₁, F₂, F₃-I, F₃-II, F₄ および F₅ のトリプシンインヒビター画分と, F₃-II, F₄ および F₅ の α -キモトリプシンインヒビター画分をえた。

Fig. 1. Gel filtration of the crude acetone insoluble inhibitor through Sephadex G-100 column (3.6×92 cm).

Trypsin inhibitor activity of each fraction was determined by the casein digestion method. Flow rate, 50 ml/hr. —, absorbance at 280 nm; ○—○, trypsin inhibitor activity.

Fig. 2. DEAE-Sephadex A-25 column chromatography.

Column, 2.5×50 cm; Flow rate, 30 ml/hr. Trypsin and α-chymotrypsin inhibitor activities of each fraction were determined by the casein digestion method. —, absorbance at 280 nm; ●—●, trypsin inhibitor activity; ○—○, α-chymotrypsin inhibitor activity; ·····, ammonium acetate (M).

Fig. 3. The rechromatography of the F_4 inhibitor on a DEAE-Sephadex A-25 column (2.5×50 cm). Flow rate, 30 ml/hr. Trypsin and α-chymotrypsin inhibitor activities of each fraction were determined by the casein digestion method. —, absorbance at 280 nm; ●—●, trypsin inhibitor activity; ○—○, α-chymotrypsin inhibitor activity; ·····, ammonium acetate (M).

Fig. 4. Sedimentation patterns.

(3) F_4 インヒビターの DEAE-Sephadex A-25 再クロマトグラフィー

Fig. 5. Electrophoresis patterns.

Fig. 6. Polyacrylamide gel disc electrophoresis.

トリプシンおよびα-キモトリプシン阻害活性の高い F_4 画分を 2°C で脱イオン水に透析し、凍結乾燥したもの 200 mg について、混合槽に、0.2 M AcOH_4 pH 5.0 (650 ml), 補給槽に 0.3 M AcONH_4 pH 5.0 (650 ml) を用いる gradient elution による、DEAE-Sephadex A-25 (2.5×50 cm) カラムクロマトグラフィーを 5°C で行ない、結果は Fig. 3 に示した。インヒビターは、2°C で脱イオン水に透析し、凍結乾燥した。

2. F_4 インヒビターの性質

(1) 純度

F_4 インヒビターは、沈降分析 (Fig. 4) および電気泳動 (Fig. 5, Fig. 6) の結果、均一であり、沈降係数

Fig. 7. Inhibiting behavior for trypsin and α -chymotrypsin.

TAME and BTEE were used as substrates for determination of inhibitor activities. On the abscissa are plotted ratios of inhibitor to enzyme, inhibitor ($\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$) per enzyme ($2\text{ }\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$). ●—●, inhibition of trypsin by F_4 inhibitor; ▲—▲, inhibition of α -chymotrypsin by F_4 inhibitor; ○—○, inhibition of trypsin by Kunitz-STI; △—△, inhibition of α -chymotrypsin by Kunitz-STI.

$S_{20,w}^0$ は 1.85 だった。

(2) 酵素阻害活性

F_4 インヒビターおよび Kunitz-STI のトリプシンと α -キモトリプシン阻害活性曲線を Fig. 7 に示した。

Fig. 8. Molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

1, bovine blood albumin fraction V; 2, pepsin; 3, trypsin; 4, α -chymotrypsin; 5, F_4 inhibitor.

Table 1. Amino Acid Composition

	g amino acid per 100 g protein Composition after hydrolysis for			Average	Moles of amino acid per mole of inhibitor
	24 hr	48 hr	72 hr		
Asp	17.02	17.14	21.88	17.08 ^a	10
Thr	3.45	3.56	3.57	3.53	2
Ser	10.58	9.73	9.49	11.00 ^b	8
Glu	12.27	12.03	14.10	12.15 ^a	7
Pro	8.38	9.15	8.07	8.53	6
Gly	0	0	0	0	0
Ala	4.92	4.92	4.67	4.80	4
Val	1.80	1.71	2.00	1.86	1
Cys/2	18.20	20.44	19.97	19.54	13
Met	2.10	2.10	2.26	2.18	1
Ile	3.20	3.21	3.31	3.24	2
Leu	3.64	3.81	3.99	3.81	2
Tyr	4.31	3.80	3.87	3.99	2
Phe	4.35	4.38	4.27	4.33	2
NH ₃	0.95	0.96	1.02	0.90 ^b	
Lys	9.80	9.80	9.59	9.85	5
His	2.21	2.38	2.60	2.40	1
Arg	5.12	5.19	5.00	5.10	2
Try ^c				0	0
Total					68
MW					8000

^a Average of 24 hr and 48 hr hydrolysates. ^b Extrapolated value to zero hr.

^c Determined spectrophotometrically⁽¹⁶⁾.

Kunitz-STI は、トリプシンを強力に阻害するが、 α -キモトリプシン阻害活性は低い。 F_4 インヒビターは、両酵素を同じように強力に阻害した。

(3) 分子量

SDS ポリアクリルアミドディスク電気泳動による分子量と移動度との関係を Fig. 8 に示した。 F_4 インヒビターの移動度は 0.9 で、分子量は約 8000 だった。

(4) アミノ酸分析

アミノ酸分析の結果は Table 1 に示した。Asp, Glu および Cys 含量が高く、Gly と Try は含まれていなかった。

(5) 末端構造分析

N末端アミノ酸については、DNP 法で Asp が検出をされた。

Fig. 9. Rate of release of amino acids from F_4 inhibitor and S-carboxymethyl F_4 inhibitor by the action of carboxypeptidase A.

The enzyme to substrate ratio was, 1:10 (M); pH 8.5, at 37°C . ●—●, Asn released from F_4 inhibitor; ▲—▲, Glu released from F_4 inhibitor; ○—○, Asn released from S-carboxymethyl F_4 inhibitor; △—△, Glu released from S-carboxymethyl F_4 inhibitor.

C末端アミノ酸は、native および過酸化したもののについては、ヒドラジン分解法で検出されなかった。CPA 法では、Fig. 9 に示したように、native なものについては、C末端アミノ酸として、Asn が2時間で1.0 モル、つづいて Glu が4時間で1.0 モル遊離し、S-S 結合還元後、カルボキシメチル化したものについては、Asn が4時間で0.6 モルの一定値に達し、Glu がAsn よりもおくれて遊離した。

(6) 物理化学的性質

F_4 インヒビターの物理化学的性質を Table 2 に示した。偏比容の値はアミノ酸分析値より算出し、等電点はインヒビターを 0.1 M 酢酸緩衝液に溶解し、pH を 2.90 から 4.30 まで変え、600 nm における吸光度を測定して決めた。吸光係数は、280 nm における既知濃度の値から算出した。

(7) 熱安定性

インヒビターを 0.001 M HCl に溶解し (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 30°C から 100°C まで密栓のできる試験管中で 20 分加熱し、 0°C に冷却後、 25°C にもどし、カゼイン消化法で酵素阻害活性を測定した。Fig. 10 に示すように、 F_4 インヒビターは、 100°C で 20 分加熱しても、酵素阻害活性は低下しなかった。

(8) F_4 インヒビターと酵素との complex の性質

F_4 インヒビターと α -キモトリプシンの complex (1:1) とトリプシンとの作用、および F_4 インヒビターとトリプシンの complex (1:1) と α -キモトリプシンとの作用を Fig. 11 に示した。これらの complex は、それぞれ、トリプシンおよび α -キモトリプシンを阻害した。

(9) トリプシン阻害に及ぼす pH および塩濃度の影響

インヒビター溶液 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0.001 M HCl) とトリ

Table 2. Physicochemical Properties of Soybean Inhibitors

	F_4	B·B ^a	1.9S ^b	AA ^c	Kunitz-STI
Molecular weight	8000	8000	16,400	24,000	21,500 ^d
Sedimentation constant ($S_{20, w}$)	1.85		1.9	2.3	2.3 ^e
Partial specific volume (ml/g)	0.70	0.69	0.69	0.75	0.74 ^b
Isoelectric point (pH)	4.0		4.0	4.2	4.5 ^f
Extinction coefficient ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ at 280 nm)	4.57	4.4	4.40	4.8	10.13 ^b
Nitrogen content (%)	16.0	15.36	15.28	15.9	16.34 ^b

^aFrattali⁷⁾, ^bYamamoto and Ikenaka⁴⁾, ^cBirk et al³⁾, ^dWu and Scheraga³¹⁾,

^eRackis and Anderson³⁾, ^fKunitz¹¹⁾.

Fig. 10. Thermal stability.

Trypsin and α -chymotrypsin inhibitor activities were determined by the casein digestion method. ●—●, inhibition of trypsin by F_4 inhibitor; ▲—▲, inhibition of α -chymotrypsin by F_4 inhibitor; ○—○, inhibition of trypsin by Kunitz-STI; △—△, inhibition of α -chymotrypsin by Kunitz-STI.

Fig. 11. Inhibition of trypsin by α -chymotrypsin- F_4 inhibitor complex and inhibition of α -chymotrypsin by trypsin- F_4 inhibitor complex.

TAME and BTTEE were used as substrates for determination of inhibiting activities. ●—●, inhibition of trypsin by F_4 inhibitor; ▲—▲, inhibition of trypsin by α -chymotrypsin- F_4 inhibitor complex; ○—○, inhibition of α -chymotrypsin by F_4 inhibitor; △—△, inhibition of α -chymotrypsin by trypsin- F_4 inhibitor complex.

ブシン溶液 (20 μ g/ml 0.001 M HCl) とを等量ずつ加えて complex を作り, その pH を 1 M HCl で低下および NaCl を 0.05 M から 1.0 M まで加えて塩濃度を変化させ, TAME を用いてトリプシン阻害活性を測定した。Fig. 12 に示すように, pH の低下とともに F_4 インヒビターのトリプシン阻害活性は低下し, pH 2.0 ではゼロになった。また, 塩濃度の増加に従っても, F_4 イ

Fig. 12. Effect of pH and salt on trypsin inhibition.

TAME was used as substrate for determination of trypsin inhibiting activity. ●—●, effect of NaCl on trypsin inhibition by F_4 inhibitor; ○—○, effect of NaCl on trypsin inhibition by Kunitz-STI; ▲—▲, effect of pH on trypsin inhibition by F_4 inhibitor; △—△, effect of pH on trypsin inhibition by Kunitz-STI.

ンヒビターのトリプシン阻害活性は低下した。

考 察

DEAE-Sephadex A-25 カラム クロマト グラフィーで分離した 6 画分は, いずれもトリプシンを阻害し, F_{3-II} , F_4 および F_8 は α -キモトリプシンも阻害したが, F_1 , F_2 および F_{3-I} はほとんど阻害しなかった (Fig. 2)。今回は, F_4 インヒビターについて諸性質を調べた。他のインヒビターについては, 今後行なう予定である。

F_4 インヒビターは, トリプシン, α -キモトリプシンを強力に阻害し, 両酵素にたいして阻害部位が異なることが推察され (Fig. 11), リマ豆インヒビター²³⁾, インゲン豆インヒビター²⁴⁾, AA インヒビター²⁵⁾と同様, double headed inhibitor と考えられる。

アミノ酸組成は, Kunitz-STI⁴⁾ とは非常に異なり, 半シスチンが約 20% 含まれ, B-B インヒビター⁷⁾および 1.9 S インヒビター⁴⁾の分析値とよく一致する。また, SH 基は BOYER²⁶⁾ および ELLMAN²⁷⁾の方法で検出されず, システインは存在しないので, 半シスチンは互いに S-S 結合を形成していることがわかる。Kunitz-STI は, 40°C を越えると酵素阻害活性が低下しはじめるが, F_4 インヒビターは熱に耐して安定であり, 100°C で 20 分加熱しても酵素阻害活性は低下しない。(Fig.

10)。これは、半シスチンが1分子中に13モル含まれ、(Table 1), SH基が存在しないことより、1分子中に6~7個存在すると推定されるS-S結合により、コンパクトな3次構造をしているためだと考えられる。

OBARAら²⁸⁾は、DEAE-セルロースで大豆より分離したトリブシンインヒビターフラクション、II, III, IV₁, IV₂, V (Kunitz-STI)の酸性溶液について熱安定性を調べ、シスチン含量の低いIIとIIIは最も安定であり、シスチン含量の高いIV₁とIV₂はあまり安定ではなく、シスチン含量のあまり高くないVは非常に不安定であったと報告している。IV₁とIV₂に関しては、シスチン含量の高いF₄インヒビターが熱に耐して非常に安定なのと対照的である。

C末端は、CPA法で-Glu-Asnのアミノ酸配列順序をなしていることがわかったが、ヒドラジン分解法では、Asnがアスパラギン酸β-ヒドラジドになり検出されなかったものと思われる。また、Gluの次のアミノ酸は認められなかったが、CPAの作用をうけないLys, Arg, ProなどがGluの次に存在するものと思われる。

F₄インヒビターのトリブシン阻害については、Kunitz-STIに比べて、pHおよび塩濃度の依存性が非常に強い(Fig. 12)。これは、トリブシンおよびF₄インヒビター表面の荷電効果の減弱や分子表面のイオン化の状態の変化によって互いに反発力を生じるためと考えられ、F₄インヒビターについては、トリブシン阻害に静電的相互作用が関与しているように思われる。

F₄インヒビターは、物理化学的性質(Table 2)がB-Bインヒビター⁷⁾とよく一致するが、1.9S⁴⁾およびAA²⁾インヒビターとは分子量がかなり異なる。FRATTALI⁷⁾は、2種類の大豆から精製したB-Bインヒビター、市販のAAインヒビターおよびIKENAKAから送られた1.9Sインヒビターのポリアクリルアミド電気泳動を行ない、4つのインヒビターは電気泳動的に同一だと報告している。

MILLARら²⁹⁾は、B-Bインヒビターについて沈降平衡法で調べた結果、可逆的に会合し、モノマーやオリゴマーの平衡関係にあり、低濃度では解離し、ゼロでは分子量8000であり、0.5%では14,000、1%では15,000になることを報告している。また、KAKADEら³⁰⁾は、市販のB-BインヒビターについてSephadex G-50によるゲル濾過で、8250という分子量を報告している。著者らは、F₄インヒビターについて沈降平衡法で濃度0.5%で、15,300という値をえている。1.9Sインヒビターの16,400⁴⁾およびF₄インヒビターの15,300はダ

イマーと考えられる。

以上、粗製アセトン不溶インヒビターより分離精製したF₄インヒビターの諸性質を調べ、他の大豆インヒビターと比較検討したが、このインヒビターは、B-Bインヒビターおよび1.9Sインヒビターと性質がよく一致するので、これらは同一インヒビターであると考えられる。

要 約

脱脂大豆の60%エタノール抽出液をアセトンで沈殿させたものを、Sephadex G-100ゲル濾過とDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーで分離し、F₁, F₂, F₃-I, F₃-II, F₄およびF₅の6種類のトリブシンインヒビターとF₃-II, F₄およびF₅の3種類のα-キモトリブシンインヒビターをえ、F₄インヒビターについて諸性質を調べた。

(1) F₄インヒビターは電気泳動的、超遠心的に均一であり、トリブシンおよびα-キモトリブシンを強力に阻害した。

(2) 分子量は8000、沈降係数は1.85だった。

(3) N末端アミノ酸はアスパラギン酸、C末端は、γ-グルタミン酸-アスパラギンのアミノ酸配列をなしていた。

(4) 熱に耐して非常に安定であり、酸性溶液を100°Cで20分加熱しても、酵素阻害活性は低下しなかった。

(5) トリブシンとα-キモトリブシンとでは阻害作用機作が異なった。

(6) トリブシンとの反応はpHおよび塩濃度の影響を強くうけた。

(7) F₄インヒビターの諸性質は、Bowman-Birkインヒビターおよび1.9Sインヒビターとよく一致した。

文 献

- 1) KUNITZ, M.: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149 (1946).
- 2) BIRK, Y., GERTLER, A. and KHALEF, S.: *Biochem. J.*, **87**, 281 (1963).
- 3) RACKIS, J.J. and ANDERSON, R.L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 230 (1964).
- 4) YAMAMOTO, M. and IKENAKA, T.: *J. Biochem.*, **62**, 141 (1967).
- 5) FRATTALI, V. and STEINER, R.E.: *Biochemistry*, **7**, 521 (1968).
- 6) BOWMAN, D.E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **63**, 547 (1946).
- 7) FRATTALI, V.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 274 (1969).
- 8) GARLICH, J.D. and NESHEIM, M.C.: *J. Nutr.*, **88**, 100 (1966).

- 9) GERTLER, A., BIRK, Y. and BONDI, A.: *J. Nutr.*, **91**, 358 (1967).
- 10) Aso, K., TAKAHASHI, Y. and MAMIYA, Y.: *Jap. J. Zootech. Sci.*, **38**, 435 (1967).
- 11) KUNITZ, M.: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).
- 12) 赤堀四郎編：酵素研究法，第2巻，初版，(朝倉書店)，p. 237 (1956).
- 13) Worthington Biochemical Corp., Enzyme Data Sheet, (1967).
- 14) DAVIS, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **21**, 404 (1964).
- 15) WEBER, K. and OSBORN, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- 16) EDELHOCH, H.: *Biochemistry*, **6**, 1948 (1967).
- 17) 岩井浩一・藤岡英子：蛋白質実験法(1)，(共立出版)，p. 5, (1967).
- 18) HIRS, C. H. W.: *J. Biol. Chem.*, **219**, 611 (1956).
- 19) 成田耕造：化学と生物，**7**, 735 (1969).
- 20) CRESTFIELD, A. M., MOORE, S. and STEIN, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 622 (1963).
- 21) AMBLER, R. P.: *Methods in Enzymology*, **XI**, (Academic Press), p. 155 (1967).
- 22) PERRY, T. L., STEDMAN, D. and HANSEN, S.: *J. Chromatog.*, **38**, 460 (1968).
- 23) HAYNES, R. and FEENEY, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 5378 (1967).
- 24) PUSZTAI, A.: *Eur. J. Biochem.*, **5**, 252 (1968).
- 25) BIRK, Y., GERTLER, A. and KHALEF, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 402 (1967).
- 26) 高木俊夫：蛋白質核酸酵素，**9**, 1337 (1964).
- 27) ELLMAN, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).
- 28) OBARA, T. and WATANABE, Y.: *Cereal Chem.*, **523** (1971).
- 29) MILLAR, D. B. S., WILICK, G. E., STEINER, R. F. and FRATTALI, V.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 281 (1969).
- 30) KAKADE, M. L., SIMONS, N. R. and LIENER, I. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **200**, 168 (1970).
- 31) WU, Y. V. and SCHERAGA, H. A.: *Biochemistry*, **1**, 698 (1962). (1972年4月12日受理)