水晒し工程におけるトランスグルタミナーゼの挙動に関する免疫学的研究

酒井 清 悟,^{1†} 久保田光俊,^{2†} 石田 貴 之,² 前川 真 吾,³ 豊原 治 彦^{1*}

(2012 年 4 月 9 日受付, 2012 年 6 月 6 日受理)

¹京都大学大学院農学研究科, ²日本水産株式会社中央研究所, ³京都大学大学院情報学研究科

Immunological studies on transglutaminase in the process of water leaching

SEIGO SAKAI,^{1†} MITSUTOSHI KUBOTA,^{2†} TAKAYUKI ISHIDA,²
SHINGO MAEGAWA³ AND HARUHIKO TOYOHARA^{1*}¹Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606-8502,²Central Research Laboratory, Nippon Suisan Kaisha, Hachioji, Tokyo 192-0991, ³Department of Intelligence Science and Technology, Graduate School of Informatics, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan

To validate the water leaching effect in the surimi manufacturing process, we immunologically investigated the occurrence of transglutaminase in waste wash and myofibril fraction of walleye pollock *Theragra chalcogramma* using anti-tgm2b antibody and found that only the myofibril fraction contained transglutaminase corresponding to the 103 kDa band. Then, we performed western blot analysis on surimi of walleye pollock, Pacific whiting *Merluccius productus*, hairtail *Trichiurus lepturus*, Atka mackerel *Pleurogrammus azonus*, threadfin bream *Nemipterus virgatus*, lizard fish *Saurida undosquamis*, chum salmon *Oncorhynchus keta* and carp *Cyprinus carpio*. As a result, transglutaminase was detected in all fish surimi tested, suggesting that all fish surimi contained transglutaminase. Next, we prepared setting gel with these fish surimi by incubating at 30°C for 0-240 min in the presence of 2.5% NaCl. As a result, the degree of polymerization was different among fishes. For example, myosin of walleye pollock, Pacific whiting, hairtail, threadfin bream and lizard fish myosins were polymerized to more than trimer, but the polymerization of Atka mackerel, chum salmon and carp myosins were terminated to dimer, although all fish surimi contained transglutaminase. These results indicated that fish-specific setting ability depends on the structure of myosin heavychain including the distribution of lysine and glutamine and/or differences in manner of myosin polymerization.

キーワード : 抗体, 重合, スケトウダラ, すりみ, 坐り, トランスグルタミナーゼ, ミオシン, 水晒し

塩すり身を 50°C 以下の温度帯で加熱すると, 透明感のある強い弾力のゲルに変わる。この反応を坐りという。¹⁾ 沼倉らはスケトウダラの冷凍すりみを用いて, 肉糊の坐りによって形成したゲルを SDS-尿素-メルカプトエタノール混液で溶解し, SDS-PAGE 分析により坐り反応がミオシン重鎖間の架橋による重合反応であることを明らかにした。²⁾ 一方, 関らはスケトウダラ冷凍すりみを用いて筋肉中に存在するトランスグルタミナーゼが, 坐り過程におけるミオシン重合反応に関わっている可能性を示唆した。³⁾ これらのことから, 坐り過程はトランスグルタミナーゼにより, ミオシン中のグルタミン

残基とリシン残基の間に ϵ -(γ -Glu)Lys のイソペプチド結合が形成され重合する反応と考えられている。⁴⁾

水晒しは, 練り製品製造工程の中で, 落し身中に含まれる血液成分や臭気成分などの除去, さらに, 色調改善やゲル形成能の強化のために活用されてきた方法であり, 特にゲル形成能の弱い魚を原料とした場合のゲル増強効果には, 威力を発揮する処理方法である。⁴⁾ 岡田はアブラカレイを試供魚に用いて, 晒し肉に筋形質タンパク質を含む全エキスを加えるとゲル形成能が低下したが, 加熱エキスを加えてもゲル形成能が低下しなかったことから, 筋形質タンパク質が足形成を阻害し, これが

* Tel/Fax : 81-075-753-6446. Email : toyohara@kais.kyoto-u.ac.jp

† 同等貢献

水晒しによって除去されるため足が増強されると報告している。⁵⁾ また、Toyohara *et al.* は、イトヨリダイでは水晒しによって戻り誘発因子が除去されることで戻らなくなると報告している。⁶⁾ 一方、Kimura *et al.* は、ホキすりみを用いて、洗浄を繰り返したすりみを用いると、坐りかまぼこのゲル形成性が著しく低下することを報告した。⁷⁾ このことから、水晒し工程は、ゲル化を阻害する水溶性タンパク質の除去とトランスグルタミナーゼの残存という両面を持ち合わせているので、晒し条件の設定は重要である。

志水らは、49種の魚の無晒し肉について坐り特性を比較し、坐りには顕著な魚種間差があることを報告した。⁸⁾ このように、魚肉の坐り特性は水晒しの有無だけでなく、それぞれの魚種に備わった特有の性質と考えられる。しかし、様々な魚種の晒し肉におけるトランスグルタミナーゼでの有無や水晒し工程でのトランスグルタミナーゼの分子レベルでの挙動に関しては不明なままである。

そこで、本研究では、抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いた免疫学的手法を用いて、水晒し工程におけるトランスグルタミナーゼの挙動を免疫学的に調べた結果、(1)すべての魚種において晒し肉にトランスグルタミナーゼが残存していること、および(2)トランスグルタミナーゼが存在しているにも関わらずミオシン重合反応から見た坐り反応は魚種により多様であること、が明らかとなった。

試料および方法

試料 コイ *Cyprinus carpio* は鮮魚を、スケトウダラ *Theragra chalcogramma* は鮮魚と冷凍すりみ（日本水産株式会社）を、パシフィックホワイティング（シロガネダラ）*Merluccius productus*、タチウオ *Trichiurus lepturus*、ホッケ *Pleurogrammus azonus*、イトヨリダイ *Nemipterus virgatus*、マエソ *Saurida undosquamis* の冷凍すりみとシロザケ *Oncorhynchus keta* の冷凍落とし身は、日本水産株式会社の製品を使用した。抗トランスグルタミナーゼ抗体は、ゼブラフィッシュトランスグルタミナーゼ（Tgm2b, BC117635）の部分配列である395～464残基目のアミノ酸配列をもとに大腸菌タンパク質発現系で合成された組み換え体トランスグルタミナーゼを抗原として、ウサギを用いて作製した。本研究においては、特に記さない限り、ナカライテスク社製特級試薬を使用した。

晒し肉の調製 水晒しは以下の方法で行い、晒し肉と晒し液を調製した。¹⁾ すなわち、ミンチ状にした新鮮なスケトウダラ筋肉に等量の純水を加え、1分間攪拌した。その後、8000×g、20分遠心分離し、沈殿と上清に分け、上清を晒し液サンプルとした。2回目と3回目の

水晒しは0.1% CaCl₂を用いて、同様の操作を行った。また、各水晒し工程における沈殿50mgを量り取り、1mLの緩衝液（50mM Tris-HCl（pH 6.8）-2% SDS）を入れ、98℃、2分加熱し、24時間振盪させ可溶化させた。また、新鮮なスケトウダラ筋肉、上記と同様の方法で晒したコイ筋肉および市販のスケトウダラ、パシフィックホワイティング、タチウオ、ホッケ、イトヨリダイ、マエソの冷凍すりみおよびシロザケの冷凍落とし身（無晒し肉）をそれぞれ50mg量り取り、1mLの緩衝液（50mM Tris-HCl（pH 6.8）-2% SDS）を入れ、100℃、2分間加熱した後、20時間振盪させ可溶化させた。サンプル調製後、micro BCA protein assay kit（Pierce社）のマニュアルに従ってタンパク質濃度を測定した。

ウエスタンブロット分析 上記のサンプルを10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動終了後、PVDF膜（GE Healthcare社）に転写して、ウエスタンブロット分析に用いた。タンパク質が転写されたPVDF膜を、1% スキムミルク/TBST（137mM NaCl-2.7mM KCl-25mM Tris-HCl-0.05% Tween-20）中において室温で30分間振盪してブロッキングを行った。次に、1% スキムミルク/TBSTで5000倍に希釈した抗tgmb2b抗体を用いて一次抗体反応を行った。反応は室温で1時間行った。一次抗体反応終了後、TBSTで5分間の洗浄作業を3回繰り返し、1% スキムミルク/TBSTで10000倍希釈した二次抗体（Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology社）を用いて二次抗体反応を行った。反応は室温で1時間行った。二次抗体反応終了後、TBSTで10分間の洗浄作業を4回繰り返し、ECL Plus Western Blotting Substrate（Pierce社）を用いて検出を行った。総タンパク質の検出は、同様に泳動したゲルをCoomassie Brilliant Blue R-250で染色することにより行った。

坐りゲルの調製 3回晒した新鮮なスケトウダラとコイおよび7種のすりみにNaClを2.5%になるように添加し、ミキサー（TESCOM, TML24）で播潰した。これらを1.5mLチューブに充填し、30℃で0～240分間加熱した。加熱後、0.1g秤量し、1mLの2% SDS-8M尿素-2% 2-メルカプトエタノール-20mM Tris-HCl（pH 8.0）溶液を加え、100℃で2分間加熱した後、室温で約20時間振盪させ可溶化させた。

アガロースゲル電気泳動 2% アガロースゲルを作製し、坐りゲルを電気泳動に供した。²⁾ 染色はCoomassie Brilliant Blue R-250を用い、脱色は、メタノール、酢酸混液により行った。

結 果

ウエスタンブロット分析による水晒し効果の評価 新

鮮なスケトウダラ筋肉を晒した液 (S1-S3) と 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)-2% SDS で可溶化させた晒し肉 (Mf1-Mf3) およびスケトウダラ冷凍すりみ (SR) のタンパク質組成を SDS-PAGE で分析した結果を Fig. 1a に示した。晒しによって、水溶性タンパク質が除去されることが示された (Fig. 1a, S1-S3)。また、市販のすりみと実験室内で調製したすりみのタンパク組成が同じであることから、実験室内でも生産現場と同様のすりみが調製されたことが示された (Fig. 1a, Mf3, SR)。

Fig. 1a と同試料に対して抗 tgm2b 抗体を用いたウエスタンブロット分析を行った結果を Fig. 1b に示した。晒し回数に関わらず、晒し肉 (Mf1-Mf3) と市販のスケトウダラ冷凍すりみ (SR) に 103 kDa のバンドが検出されたが、晒し液 (S1-S3) には、このバンドは検出されなかった。ゼブラフィッシュトランスグルタミナーゼの分子量が 100 kDa 付近であることから (投稿準備中)、今回スケトウダラで検出された 103 kDa のバンドはトランスグルタミナーゼと考えられる。そのほか 175 kDa 付近や 37 kDa 付近にもバンドが検出されたが、これらについては考察で述べる。

スケトウダラ晒し肉と冷凍すりみのミオシン重合反応 実験室で調製した晒し肉が市販のすりみと同程度の架橋反応を起こすかどうかを明らかにする目的で、NaCl を添加し塩ずりした肉糊を 30°C で加熱したものについて、上記で調製した晒し肉と市販のすりみのミオシンの重合の程度を比較した (Fig. 2)。その結果、実験室で調製したすりみも加熱時間に依存して高分子のミオシン重鎖の多量体 ((MH)_n) を形成することが明らかとな

った。なお、Fig. 2 において高分子域に検出されたコネクチンと推測されるタンパク質は加熱時間に伴い分解することが確認された。

様々な魚種に対するウエスタンブロット分析 スケトウダラ以外の魚種のすりみにおいても、トランスグルタミナーゼが残存しているか調べる目的で、パシフィックホワイティング、タチウオ、ホッケ、イトヨリダイ、マエソのすりみ、シロザケ落とし身、及びコイから調製した晒し肉を 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)-2% SDS に可溶化させたものに対し、抗 tgm2b 抗体を用いてウエスタンブロット分析を行った。その結果、Fig. 3a に示すように、ミオシン重鎖のバンドの濃さは異なるものの、すべての市販のすりみと調製したコイ晒し肉は同じタンパク質パターンを示した。Fig. 3b に示すように、すべての魚種のすりみに加え、コイの晒し肉においても 103 kDa 付近にバンドが検出され、トランスグルタミナーゼが残存していることが確認された。シロサケのみ 37 kDa にもバンドが検出された。

様々な魚種のミオシン重合反応 Fig. 3 の結果から、すべての市販のすりみとコイ晒し肉にトランスグルタミナーゼが検出されたことから、魚種ごとのトランスグルタミナーゼのミオシン重合反応への関与を検討した。Fig. 3 と同試料のすりみから調製した坐りゲルを可溶化させた後、アガロースゲル電気泳動に供した結果を Fig. 4 に示した。パシフィックホワイティングとタチウオは、加熱時間の経過とともに単量体ミオシンが減少し、それと平行して多量体ミオシンが検出された (Fig. 4a, b)。イトヨリダイとマエソでは加熱時間の経過とと

Fig. 1 SDS-PAGE and western blot analyses on washed walleye pollock meat. (a) Proteins stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (b) Proteins recognized by anti-tgm2b. 5 μ g of protein was used for each lane. MH, myosin heavy chain; AC, actin; WM, whole muscle; S1-S3, supernatant fractions 1-3; Mf1-3, myofibril fractions 1-3; SR, surimi; M, marker. Molecular weight of transglutaminase was estimated from mobility of protein markers as shown in the figure.

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic analyses on walleye pollock setting gel. Washed fresh meat (a) and frozen surimi (b) were set at 30°C for 0–240 min. 2.5 μ g of protein was used for each lane. MH, myosin heavychain; (MH)₂, myosin heavychain dimer; (MH)₃, myosin heavychain trimer; (MH)_n, myosin heavychain polymer; Con, connectin.²⁾

Fig. 3 SDS-PAGE and western blot analyses on various washed surimi. (a) Proteins stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (b) Proteins recognized by anti-tgm2b. 5 μ g of protein was used for each lane. MH, myosin heavychain; AC, actin; PW, Pacific whiting; HT, hairtail; AM, Atka mackerel; TB, threadfin bream; LF, lizardfish; SM, chum salmon; CP, carp; M, marker.

もにミオシン重鎖が重合するとともにミオシン重鎖の二量体や三量体が検出された (Fig. 4c, d)。ホッケとシロザケおよびコイの晒し肉では、ミオシン重鎖の二量体が検出されるにとどまった (Fig. 4e–g)。イトヨリダイ、マエソ、及びホッケにおいては、加熱に伴いミオシンの分解産物と思われるタンパク質が検出された (Fig. 4c–e)。タチウオ、イトヨリダイ、マエソ、コイにおいては、加熱 0 分においてもミオシン重鎖の二量体が検出されたが、これは塩ずり肉調製過程においてすでにミオシン重鎖の二量体が形成していたと考えられる。

考 察

スケトウダラ筋肉の晒し液と晒し肉に対してウエスタンブロット分析を行った結果、晒し肉にのみトランスグルタミナーゼと思われる 103 kDa のバンドが検出された (Fig. 1b, Mf1–3)。関らは、スケトウダラのトランスグルタミナーゼをゲルろ過で精製し、そのピークから分子量を見積もったところ約 85000 と報告している。³⁾ この値は、我々がウエスタンブロット分析によって算出した値とは異なるが、この理由としては、我々のウエスタンブロット分析は SDS 存在下の変性条件で行ったためと考えられる。また、175 kDa 付近に見られるバンド

Fig. 4 Agarose gel electrophoretic analyses on setting gel. Pacific whiting (a), hairtail (b), threadfin bream (c), lizardfish (d), Atka mackerel (e), chum salmon (f) and carp (g) were set at 3°C for 0–240 min. 2.5 μ g of protein was used for each lane. MH, myosin heavychain; (MH)₂, myosin heavychain dimer; (MH)₃, myosin heavychain trimer; (MH)_n, myosin heavychain polymer.

(Fig. 1b) は、抗原濃度を段階的に希釈した際に 103 kDa のバンドは残存したにもかかわらず消失したため (データは示さず)、非特異的に検出されたバンドだと思われる。さらに、晒し液 (S1) で本抗体と交差する 37 kDa のバンドが検出されたが、このバンドは無晒し肉 (WM) では検出されなかった (Fig. 1b)。この理由としては、晒し液 (S1) は無晒し肉 (WM) に比べ相対的に水溶性タンパク質濃度が高いために、無晒し肉 (WM) では検出されなかった 37 kDa のタンパク質が

検出されたと思われる。37 kDa のバンドはシロザケでも検出されており (Fig. 3b)、これはシロザケでは落とし身を用いたためと考えられる。スケトウダラやシロザケで検出された 37 kDa のタンパク質が、103 kDa のトランスグルタミナーゼの分解産物であるのか、別種のトランスグルタミナーゼであるのかについては今後の課題である。

SDS-PAGE 分析により、晒し液中に水溶性タンパク質が検出された (Fig. 1a)。これらのタンパク質は、ク

レアチンキナーゼ、アルドラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ等の解糖系酵素が主要な構成成分であるが、ゲル形成に阻害的に働く内因性プロテアーゼも含まれる。⁵⁾ 一方、ウエスタンブロット分析では、晒し液中にトランスグルタミナーゼは検出されず、晒し肉にのみ検出された (Fig. 1b)。これらのことから、スケトウダラすりの生産現場での水晒し法は、阻害効果のある水溶性タンパク質を効果的に除去するとともに、坐り反応に重要な寄与をすると考えられるトランスグルタミナーゼを残存させる条件で行われていると考えられる。

Fig. 3 に示すように、今回作製した抗体を用いて様々な魚種の冷凍すりみに対してウエスタンブロット分析を行った結果、すべての魚種に Fig. 1 と同様に 103 kDa 付近にバンドが検出された。このことから、本抗体は広く魚種間で交差することがわかった。今回作製した抗体は、動物種間で相同性の高い領域を抗原としたため、すべての魚種においてトランスグルタミナーゼが検出されたと考えられる。

志水らは、海産硬骨魚 41 種のゲル形成特性を評価しており、今回試料とした魚種ではスケトウダラ、タチウオおよびマエソは坐りやすい魚と、コイは坐りにくい魚であると報告している。⁸⁾ また、塚正らは、コイ肉にカルシウムを添加し、30℃で2時間加熱してもミオシン重鎖の多量化がほとんど認められなかったことから、コイは坐り難い魚であると報告した。¹¹⁾ Fig. 2 と Fig. 4 の結果においても、スケトウダラ、タチウオ、マエソはミオシン重鎖の多量体を形成し、コイはミオシン重鎖の二量体形成で反応が停止したことから、コイが坐りにくい魚であることが確認された。

イトヨリダイ、マエソおよびホッケにおいて検出された分解バンドは、内在性のプロテアーゼによりミオシンが分解されたためと考えられる (Fig. 4c-e)。¹²⁾ Fig. 4d に示すようにマエソでは、加熱 100 分で多量体の形成が最大になり、その後は加熱時間とともに多量体の減少が観察されたことから、ミオシン重合体がプロテアーゼにより分解を受けている可能性が示唆された。

本研究の結果から、魚種によりミオシン重鎖の重合の程度が著しくことが確認された。それでは、魚種によるミオシン重鎖の重合の程度の違いはどのようなメカニズムによるのだろうか。先行研究からトランスグルタミナーゼによりモノダンシルカダベリンが、スケトウダラとコイのミオシン S2 領域の 520 番目のグルタミン残基に共通して取り込まれることが報告されていること¹⁷⁾を考慮すると、グルタミンと架橋を形成するリシン残基についてもスケトウダラとコイで同一部位のものが使われている可能性が考えられる。この可能性をさらに示唆する結果として、トランスグルタミナーゼ活性は

ミオシン重鎖の架橋重合速度と直接相関しておらず、ミオシンの構造に基づく架橋のされやすさに依存していること、及び坐りにくいとされているコイのミオシンでも熱変性すると多量体形成が可能ことが報告されている。^{18,19)} この事実は、熱変性することでミオシンの立体構造が変化し、トランスグルタミナーゼの基質認識に変化が起これ、ミオシンの重合様式が異なるからではないだろうか。

今後は、スケトウダラとコイのミオシンの架橋反応に関わるリシン残基が同一部位なのかの確認と、熱変性によるコイミオシンのトランスグルタミナーゼの基質認識に変化をもたらす立体構造の変化を明らかにしていく必要がある。

文 献

- 1) 岡田 稔. 「新訂かまぼこの科学」成山堂書店、東京. 2008; 56-77, 126-152.
- 2) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一. 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応. 日水誌 1985; **51**: 1559-1565.
- 3) 関 伸夫, 宇野秀樹, 李 南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一. スケトウダラ筋肉およびすりみのトランスグルタミナーゼ活性とミオシン B との反応. 日水誌 1990; **56**: 125-132.
- 4) 山澤正勝, 関 伸夫, 福田 裕. 「かまぼこ その科学と技術」恒星社厚生閣、東京. 2003; 67, 117.
- 5) 岡田 稔. かまぼこの足に対する水晒しの影響. 日水誌 1964; **30**: 255-261.
- 6) Toyohara H, Kinoshita M, Shimizu Y. Proteolytic degradation of threadfin-bream meat gel. *J. Food Sci.* 1990; **55**: 259-260.
- 7) Kimura I, Sugimoto M, Toyoda K, Seki N, Arai K, Fujita T. A study on the cross-linking reaction of myosin in Kamaboko "Suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 1389-1396.
- 8) 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一. 魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性. 日水誌 1981; **47**: 95-104.
- 9) Nakagawa T, Watabe S, Hashimoto K. Electrophoretic analysis of sarcoplasmic proteins from fish muscle on polyacrylamide gels. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 993-998.
- 10) Nakagawa T, Watabe S, Hashimoto K. Identification of three major components in fish sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 999-1004.
- 11) 塚正泰之, 志水 寛. トランスグルタミナーゼによる坐りに関与するいくつかの要因. 日水誌 1991; **57**: 535-540.
- 12) Suwansakornkul P, Itoh Y, Hara S, Obatake A. Identification of proteolytic activities of gel-degrading factors in three lizardfish species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1039-1045.
- 13) Muramatsu-Uno M, Kikuchi K, Suetake H, Ikeda D, Watabe S. The complete genomic sequence of the carp fast skeletal myosin heavy chain gene. *Gene* 2005; **349**: 143-151.
- 14) Iwamni Y, Ojima T, Inoue A, Nishita K. Primary structure of myosin heavy chain from fast skeletal muscle of Chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2002;

- 133B**: 257–267.
- 15) Ojima T, Kawashima N, Inoue A, Amauchi A, Togashi M, Watabe S, Nishita K. Determination of primary structure of heavy meromyosin region of walleye pollock myosin heavy chain by cDNA cloning. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 812–819.
  - 16) Togashi M, Kakinuma M, Hirayama Y, Kukushima H, Watabe S, Ojima T, Nishita K. cDNA cloning of myosin rod and complete primary structure of myosin heavy chain of walleye pollock fast skeletal muscle. *Fish. Sci.* 2000; **66**: 349–357.
  - 17) Nozawa H, Ezou M. Identification of the glutamine residue that maybe involved in the transglutaminase-mediated intramolecular crosslinking of carp and walleye pollack myosin. *Fish. Sci.* 2009; **75**: 1445–1452.
  - 18) Araki H, Seki N. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 711–716.
  - 19) 塚正泰之, 三宅康賀, 安藤正史, 牧之段保夫. 熱変性したコイのアクトミオシンに対する内在性トランスグルタミナーゼの影響. *日水誌* 2000; **66**: 469–474.