筋肉アルカリ性プロテアーゼの研究—V

かまぼこの“もどり”におよぼすコイの筋肉
内アルカリ性プロテアーゼの影響

岩田和士・小橋恭一・長谷純一

(1974年7月3日受理)

Studies on Muscle Alkaline Protease—V

Effect of Carp Muscular Alkaline Protease upon “Modori” Phenomenon
in Kamaboko ProductionKazushi IWATA,*¹ Kyoichi KOBASHI,*² and Jun'ichi HASE*²

These investigations were performed to clarify the effects of the alkaline protease purified from white muscle of carp, *Cyprinus carpio* and its potent inhibitors upon the “Modori” phenomenon in Kamaboko prepared from carp white muscle. The enzymatic activity was not inhibited by chicken egg white, soybean trypsin inhibitor, carp plasma, TLCK or *t*-AMCHA, but was considerably inhibited by leupeptin, ovomucoid, TPCK, antipain, K_s, NEM and NBS. Therefore, the enzymatic properties of this protease seem to be similar to those of α -chymotrypsin. The degree of “Modori” of Kamaboko prepared from the washed muscle was considerably less than that from the unwashed muscle, though about 70% of the enzymatic activity still remained in the washed muscle. This result could be explained by the inhibitory effect of added sodium chloride on the enzymatic activity. However, the “Modori” phenomenon in Kamaboko prepared from the unwashed muscle was not prevented by the addition of enzyme inhibitors such as K_s, NEM, or NBS, and only partially by leupeptin. And also the elasticity of Kamaboko prepared from the muscle which was treated to remove most of the enzyme and sarcoplasmic proteins was not reduced by the addition of the enzyme. From these results it may be concluded that the enzyme in muscle does not take part in the “Modori” phenomenon in Kamaboko production.

すでに著者らは魚類の筋肉アルカリ性プロテアーゼ（以下本酵素とする）に関する一連の研究において、本酵素の分布¹⁾、抽出および精製法、酵素学的、物理化学的諸性質²⁻⁴⁾らについて報告した。

今回、コイのかまぼこの“もどり”におよぼすコイの筋肉内アルカリ性プロテアーゼおよびその阻害剤の影響を検討した。また、プロテアーゼおよびエステラーゼ活性についてトリプシン、 α -キモトリプシンと本酵素を比較し、これら酵素活性に対する各種阻害剤の影響を明らかにしたので報告する。

実験材料および方法

材料 酵素活性測定用の基質のうち N-ベンゾイル-L-アルギニン-エチルエステル (BAEE)、および N-アセチル-L-チロシン-エチルエステル (ATEE) は蛋白質奨励会より購入した。N-カルボベンゾオキシ-L-チロシン-P-ニトロフェニルエステル (ZTNE) は ISELIN らの方法⁵⁾に従いカルボベンゾオキシ-L-チロシンと P-ニトロフェノールをジシクロヘキシルカルボジイミドで縮合させ、酢酸エチルとエーテルより再結

*¹ 富士薬品工業株式会社 (Fuji Chem. Ind. Ltd., Chokeiji, Takaoka-shi, 933)

*² 富山大学薬学部 (Faculty of Pharm. Sci., Univ. of Toyama, Gofuku, Toyama-shi, 930)

晶 (m.p., 155–7°C) した。アクトミオシン (AM) は常法によりコイ *Cyprinus carpio* の骨格筋普通肉から 3 回沈殿-溶解を繰り返して調製した。酵素阻害剤のうち 1-クロロ-3-トシルアミド-7-アミノ-2-ヘプタノン (TLCK) は Sigma. Chem. Corp., L-1-トシルアミド-2-フェニール-エチル-クロロメチル-ケトン (TPCK) は生化学工業, 大豆トリプシンインヒビター (STI) は Miles-Seravac, オボムコイドは Miles Lab., *trans*-4-アミノメチルシクロヘキサノカルボン酸 (*t*-AMCHA) は第一製薬より購入し, アセチル-またはプロピオニル-L-ロイシル-DL-アルギニナル^{6,7)} (ロイペプチン), および [(S)-1-カルボキシル-2-フェニールエチル] カルバモイル-L-アルギニル-L-バリル-アルギニナル⁸⁾ (アンチパイン) は微生物化学研究所, 梅沢浜夫博士より贈与された。また, コイの血漿は尾部を切断し, 5,000 u/ml のヘパリン (エーザイ製) を塗布したビーカーに採血し, 3,000 rpm, 10 分間遠心分離し, その上澄を使用した。

酵素の調製 アルカリ性プロテアーゼは養殖業者より活魚のまま入手したコイの骨格筋普通肉より前報²⁾に述べた方法に従って分離精製した。トリプシンは凍結乾燥トリプシン (Worthington Biochem. Corp. 製) を CARPENTER の方法⁹⁾に従って TPCK 処理した。 α -キモトリプシン (Nutritional Biochem. 製) は 1 mM HCl に対して一夜透析して使用した。

酵素活性の測定 プロテアーゼ活性はハンマーシュテインカゼイン, または AM を基質として前報の方法²⁾, あるいは KUNITZ の方法¹⁰⁾に従って測定した。エステラーゼ活性は BAEE, または ATEE を基質として SCHWERT からの¹¹⁾変法で National Formulary XII に記載の方法¹²⁾に従った。ZTNE を基質にした場合は MARTIN らの方法¹³⁾に従った。

かまぼこの弾力の測定 コイの普通肉を肉挽機で細切した無晒し肉, 約 5 倍量の冷蒸留水で 3 回水晒した水晒し肉, および前報の方法²⁾に従って 0.1 M 食塩溶液で本酵素を抽出除去した残渣を透析用チューブに詰めシリカゲル中に埋没し水分含量を約 82% に低下させた肉の 3 種類をかまぼこ原料とした。なお, 無晒し肉と水晒し肉との水分が異なる場合は冷蒸留水で水分含量 (%) を同一になるよう調製した。これら原料肉に含有水分あたり 2.5% 食塩と 0.2–0.25% のピロリン酸ナトリウムを加えて塩ずり肉を調製した。塩ずり肉は径 3 cm のクレーンケーシングに詰め, 所定の温度で一定時間加熱しかまぼこを調製した。試料かまぼこの弾力の強さを官能テスト評点 10 点満点で採点し, 同時に岡田式ゼリー強度計によるゼリー強度¹⁴⁾, 圧出水分量¹⁴⁾の測定, および折り曲げテスト¹⁵⁾を行ない “もどり” の程度を判定した。

原料肉の筋形質たんぱく質溶出量 かまぼこ原料肉各々 10 g に 90 ml の 3.3 mM KH_2PO_4 –15.5 mM Na_2HPO_4 , (I=0.05, pH 7.2) を加え泡止め板つきブレンダー中で 90 秒間組織を破壊した。このホモジネートを 5,000 × g で 30 分間遠心分離し, その上澄液中のたんぱく質を定量した。

たんぱく質の定量 ウシ血清アルブミン (フラクション V, Armour 社製) を標準たんぱく質とし, AM および筋形質たんぱく質はマイクロビュレット法^{16,17)}で, 酵素類は LOWRY らの方法¹⁸⁾で定量した。

結果および考察

プロテアーゼ活性の比較 カゼインおよびコイの AM を基質としてコイの筋肉内アルカリ性プロテアーゼの力価を同じ弱アルカリ性に至適 pH を持つトリプシンおよび α -キモトリプシンの力価と比較した (Table 1)。カゼインを基質にした場合, 本酵素活性はトリプシン活性と比較するといずれの測定法でもそれのわずか 2–3% しかなく, また 0.5 M 食塩存在下 AM を基質とした場合はさらに低く 0.1% であった。また, トリプシンおよびキモトリプシンの代表的合成基質である BAEE, ATEE や ZTNE が, 本酵素の基質となりうるか否かを検討した。しかしながらコイの本酵素はこれらの分解能を有せず, これら合成基質に対するエステラーゼ活性はないと考えられる。なお, 本酵素はカゼインを基質とした場合温度 65°C³⁾, 40 分で見掛けの反応量は最大であったが, 同条件下でもこれら合成エステル類を加水分解しなかった。

各種阻害剤の影響 著者らはすでに本酵素活性に及ぼす各種阻害剤の影響について報告した³⁾。今回たんぱく加水分解酵素阻害剤がトリプシン, α -キモトリプシンおよびコイの本酵素の活性に及ぼす影響を比較し, Table 2 に示した。AOYAGI ら^{7,19)}は放射菌の産生するロイペプチンはトリプシン, パパイン, トロンボキナーゼ活性らを強く阻害し, またヒト, ウサギの血液凝固時間を延長すると報告している。表から明らか

Table 1. Comparison of proteolytic activity of trypsin and α -chymotrypsin with that of carp alkaline protease

Method	Substrate	Enzyme	Relative activity (%)	Condition
KUNITZ's	Casein	Trypsin	100	pH 7.6, 50°C, 5 min
	Casein	α -Chymotrypsin	82	7.6, 50, 5
	Casein	Carp alkaline protease	2.1	8.1, 65, 40
Our	Casein	Trypsin	100	7.6, 50, 5
	Casein	Carp alkaline protease	2.6	8.2, 65, 40
	AM	Carp alkaline protease	0.1	9.1, 65, 40

Proteolytic activities were determined by KUNITZ's method¹⁰⁾ at 50°C in the presence of 0.5% casein as substrate or by our method, as described in our previous paper²⁾ in the presence of 1% casein or 0.15% carp actomyosin (AM) containing 0.5 M sodium chloride. The relative activity was calculated on the basis of the specific activity of trypsin for caseinolysis.

Table 2. Apparent I_{50} values of various inhibitors on caseinolytic activity of trypsin, α -chymotrypsin and carp alkaline protease.

The residual activity of trypsin and α -chymotrypsin was determined at 35°C by KUNITZ's method¹⁰⁾ toward 0.5% casein as substrate, after preincubation with inhibitor of various concentrations at 35°C for 10 min. The activity of carp alkaline protease was determined at 65°C in the presence of 1% casein as substrate by the method described in our previous paper²⁾, after preincubation with the inhibitor at 37°C for 30 min.

Inhibitors	Trypsin	α -Chymotrypsin	Alkaline protease
Leupeptin*	$I_{50}=2.6 \times 10^{-6}$ M	(6% inhibition, 6.6×10^{-5} M)	$I_{50}=2.3 \times 10^{-6}$ M
Antipain	$I_{50}=1.3 \times 10^{-6}$ M	$I_{50}=1.0 \times 10^{-4}$ M	$I_{50}=1.3 \times 10^{-4}$ M
Ovomucoid	$I_{50}=1.1 \times 10^{-7}$ M	$I_{50}=7.9 \times 10^{-6}$ M	$I_{50}=5.1 \times 10^{-5}$ M
Chicken egg white	$I_{50}=2.4 \times 10$ μ g/ml	$I_{50}=2.8 \times 10^2$ μ g/ml	(15% inhibition 7.9×10^3 μ g/ml)
STI	$I_{50}=1.8 \times 10^{-7}$ M	$I_{50}=8.1 \times 10^{-7}$ M	(no inhibition, 1.0×10^{-4} M)
Carp plasma	$I_{50}=6.0 \times 10$ μ g/ml	$I_{50}=5.9 \times 10$ μ g/ml	(10% inhibition, 3.0×10^3 μ g/ml)
TLCK	$I_{50}=8.5 \times 10^{-6}$ M	—	(no inhibition, 6.5×10^{-5} M)
TPCK	—	$I_{50}=3.8 \times 10^{-5}$ M	$I_{50}=8.7 \times 10^{-6}$ M
<i>t</i> -AMCHA	$I_{50}=2.2 \times 10^{-2}$ M	(no inhibition, 4.0×10^{-2} M)	(no inhibition, 5.1×10^{-2} M)

* The molecular weight was calculated as propionyl-L-leucyl-L-leucyl-DL-argininal.

The molecular weights of ovomucoid and STI were taken to be 27,000 and 20,000 respectively.

のようにロイペプチンは α -キモトリプシン活性を阻害しないが、トリプシン活性を強く阻害しAOYAGIら^{7,19)}と同様の結果を得た。本酵素活性もトリプシンと同程度に強く阻害され、その見掛けの I_{50} 値は 2.3×10^{-6} M であった。

アンチパインはトリプシン、パパインおよびブタ肝臓のカテプシン A, B 活性を強く阻害する^{8,20)}と報告されている。著者らの結果でもアンチパインはトリプシン活性を強く阻害したが、本酵素活性に対する阻害力はロイペプチンの約 60 分の 1 と小さかった。

STI によりトリプシンおよびキモトリプシンの活性は強く阻害されたが、本酵素活性は全く阻害されなかった。オボムコイドについて DAVIS ら²¹⁾は、ニワトリのオボインヒビターはトリプシン、キモトリプシン、ナガーゼ、プロナーゼなどのたんぱく加水分解酵素活性を阻害すると報告している。また FEENEY ら²²⁾はこの阻害はオボムコイド中に混在しているオボインヒビターによると述べている。オボムコイドによる阻害は

Fig. 1. Effect of ovomucoid on the caseinolytic activity of trypsin, α -chymotrypsin and carp alkaline protease.

The residual activity was determined by the same method as described in the legend of Table 2. The symbols refer as follows: —x—: trypsin; —●—: α -chymotrypsin; —○—: alkaline protease.

ml)でもわずかに10%しか阻害されなかつた。また抗プラスミン剤として使用されている *t*-AMCHA のトリプシンに対する I_{50} 値は $2.2 \times 10^{-2} M$ と大であつたが、本酵素ではその倍以上の濃度 ($5.1 \times 10^{-2} M$) でも阻害は全く認められなかつた。

トリプシンの特異的阻害剤 TLCK²⁷⁾ のトリプシンに対する I_{50} 値は $8.5 \times 10^{-6} M$ であつたが、本酵素に対してはその約10倍の濃度 ($6.5 \times 10^{-5} M$) においても阻害を示さなかつた。また α -キモトリプシンの阻害剤 TPCK²⁸⁾ はキモトリプシンに対しその I_{50} 値、 $3.8 \times 10^{-5} M$ を得たが、本酵素に対するそれはその約2倍 ($8.7 \times 10^{-5} M$) であつた。

ナガスクジラのカチオニックキモトリプシン²⁹⁾、イソギンチャクプロテアーゼ A³⁰⁾ およびスズメバチ幼生中腸のプロテアーゼ³¹⁾ はいずれも TPCK で阻害されることからキモトリプシン様酵素とされている。本酵素は TPCK により阻害され、卵白、STI、血漿たんぱく性トリプシン阻害剤、および TLCK、*t*-AMCHA などで阻害されないか、されても僅かであることより、トリプシンよりはむしろキモトリプシン様酵素であろうと考えられる。すなわち基質特異性がキモトリプシンに近いことを示唆している。しかしロイペプチンに対する態度は全く異なりトリプシンに近いが、これはおそらく酵素活性部位周辺の構造が部分的にトリプシンに類似しているためであろう。

本酵素ともどりの関係 次にかまぼこの“もどり”現象が本酵素活性に基因するか否かを論ずるために、まずコイの普通肉より調製した塩ざり肉を $65^\circ C$ で加熱し、本酵素の活性と弾力の経時変化を測定し、その結果を Fig. 2 に示した。水晒しに関係なく3時間加熱しても本酵素活性は全く変化していなかつた。精製本酵素は $65^\circ C$ 、20分で完全失活するが、カゼインおよび筋形質たんぱく質らが共存すると失活は阻止されることを先に報告⁴⁾した。今回の結果も材料中の他のたんぱく質の保護効果によるものであろう。一方かまぼこの弾力は無晒し肉、水晒し肉ともに加熱時間とともに“もどり”の程度は進行した。このことは、志水ら³²⁾のワニエソ肉の塩ざり肉を用いた報告、すなわち“もどり”は時間とともに進行し、その弾力崩壊速度は原料肉の鮮度、あるいは pH に左右されることと一致する。しかし図で明らかのごとく、水晒し肉では無晒し肉に比し“もどり”の程度は弱くまた進行は緩慢であつた。この傾向は圧出水分試験のみならず官能テスト評点、および折り曲げテストの結果からも認められた。この原因について考察すると、水晒し操作

トリプシンが最も強く、続いて α -キモトリプシンであり、本酵素はトリプシンの約500分の1であつた。この阻害度の差はオボムコイドの代りに新鮮なニワトリの卵白を用いても同様に認められた。また Fig. 1 で明らかなようにオボムコイドはトリプシンと化学量論的に作用し等モルで完全に阻害した。完全阻害時のオボムコイドに対する α -キモトリプシンおよび本酵素のモル比はそれぞれ約60および25,000であつて、オボムコイドのこれら酵素に対する阻害様式はトリプシンのそれと異なることを示している。

ヒト、ウシの血漿にはトリプシンのみならずプラスミン、キモトリプシン、トロンビンらの阻害因子が含まれていると報告されている²³⁻²⁶⁾。コイの血漿中にも、哺乳動物と同程度にトリプシンおよび α -キモトリプシン活性を阻害する因子が存在し、その見掛けの I_{50} 値は共に $60 \mu g$ たんぱく/ml であつた。しかしながら、本酵素活性はコイの血漿によつて $3 \times 10^3 \mu g$ たんぱく/ml

Fig. 2. Residual activity of alkaline protease in Kamaboko (A) and elasticity of Kamaboko (B) prepared from carp white muscle.

A: Unwashed muscle (—●—) or washed muscle (—○—) was brayed with 0.53 M sodium chloride and 7 mM pyrophosphate, followed by heating at 65°C for the indicated period, and then the sample was immediately cooled in an ice water-bath. The alkaline protease was extracted from the meat pastes and all the Kamaboko samples with 5 mM phosphate-2.5 mM borate buffer solution, pH 6.5, containing 0.1 mM EDTA, and dialyzed against the same extractant overnight. The enzymatic activity was determined at pH 8.1 for 60 min in the presence of 1% casein, as described previously²¹. The residual activity was expressed as the percentage of the original total activity of the meat paste of unwashed muscle. B: For the determination of the elasticity, all the samples were heated at 85°C for 30 min, after heating at 65°C for the indicated period. The numerals and alphabetic codes in the figure are a measure of organoleptic score of Kamaboko, using the 0-10 scale rating and folding test.

により本酵素活性は約 70% 残存していること、他方弾力低下因子といわれている筋形質たんぱく質³³⁾が約 50% に低下していることなどより、この現象は前者の酵素分解よりは後者の影響が大きいと考えられる。また水分含量を無晒し肉のそれと同一に調節したため、水晒し肉では相対的な筋原線維性たんぱく質の濃度が高まったことにより弾力に与える影響が小さくなったのかも知れない。これらのことについては原料魚の種類および鮮度の問題と合わせて今後の課題としたい。

牧之段ら³⁴⁾はマエソの無晒し肉、高木^{35,36)}はマアジの無晒し肉を用い加熱時間と“もどり”の関係を調べ志水ら³²⁾と同様の結果を報告しており、その“もどり”の原因を肉中の本酵素によると推論している。しかしいずれも本酵素が“もどり”を引き起こしているという直接的な証明ではない。そこで著者らが前報²⁾で述べた本酵素の精製課程で、本酵素および筋形質たんぱく質の大部分が除去された抽出残渣肉を用い塩ずり中に精製本酵素を添加し、“もどり”現象が認められるか否かを検討した。残渣肉 100 g 当りコイの筋肉中の約 4 倍量に相当する本酵素 37 mg を添加し 45, 65, 85°C でそれぞれ 1 時間加熱時の弾力の測定結果を Fig. 3 に示した。水晒しを充分行ない大部分の水溶性区分を除去した本酵素無添加の対照区ではいずれの加熱区においても圧出水分量、官能テスト、および折り曲げテストの結果に殆んど差がなく“もどり”現象は認められなかった。一方、本酵素添加区においては 65°C 加熱区でゼリー強度値が対照区と比較して若干低い結果を得たが、その他の圧出水分量、官能テスト、および折り曲げテストの結果ではいずれの加熱区においても有意な差を認め得なかった。このように対照区の 65°C 加熱で“もどり”現象が殆んど認められない条件下の肉に過剰の本酵素を添加しても“もどり”は起きなかった。しかしながら比較のためトリプシンを添加し同様に処理したものについてはいずれの加熱区も著しく弾力が損なわれた。添加トリプシンの活性が添加本酵素の活性に比較して強いので、これらの結果から定量的にトリプシンと本酵素の“もどり”に対する影響を比較することは出来ないが、トリプシン様のプロテアーゼの添加は明らかにかまぼこの弾力を減弱させる。したがって“もどり”の主要因子としては、除去された魚肉水溶性たん白質中の本酵素とは考えられない。

Fig. 3. Effect of carp alkaline protease and trypsin on elasticity of Kamaboko prepared from carp white muscle.

After extraction of alkaline protease from carp white muscle with 0.1 M sodium chloride as an extractant, as described previously²⁾, the residual blended muscle was packed in a Visking tube and its moisture content was reduced to 82% by silica gel at 3°C for about 50 hr, followed by braying with a mixture solution of 0.52 M sodium chloride, 5.4 mM pyrophosphate, 1.2 mM EDTA and 1.2 mM 2-mercaptoethanol. The meat paste was divided into 3 parts. The first part was mixed with 37 mg % purified alkaline protease (total caseinolytic activity, 45 A_{280}/min) of carp white muscle and the second with 9.9 mg % trypsin. The three kinds of samples were heated at the indicated temperature for 60 min, and then the samples were heated at 85°C for 30 min. The symbols were as follows: open area: no additive; shaded area: carp alkaline protease; black area: trypsin; x: the samples were too fragile to determine elasticity.

Fig. 4. Effect of potent inhibitors of carp alkaline protease on the elasticity of Kamaboko prepared from carp white muscle.

Unwashed muscle was brayed with 0.52 M sodium chloride, 6.8 mM pyrophosphate and inhibitors dissolved in distilled water, followed by keeping at 3°C overnight. Then the samples were heated at the indicated temperature for 2 hr, and then all the samples were immediately heated at 85°C for 30 min. The concentration of inhibitors used was approximately 100 folds of their apparent I_{50} values in molar bases, which were reported previously³⁾. The numerals in the figure were as follows: 0: no additive; 1: 2.2×10^{-3} M K_3 ; 2: 6.5×10^{-4} M NEM, 3: 2.3×10^{-4} M leupeptin; 4: 8.0×10^{-5} M NBS.

本酵素阻害剤の“もどり”に対する影響 先に著者ら³⁾は本酵素活性が活性食塩により阻害され、その I_{50} 値は $9 \times 10^{-2} M$ であると報告した。実際のねり製品の食塩濃度約 $0.5 M$ では 95% 以上阻害され、この濃度におけるトリブシンおよび α -キモトリブシンの阻害がそれぞれ 25%、10% であるのと比し、本酵素活性への食塩の影響が大きいことが明らかである。このこともまた本酵素の添加効果がなかったことの原因の一つかもしれない。

しかしながら、食塩では本酵素活性は完全には阻害されないため、本酵素の“もどり”に対する影響を全く無視することはできない。このため本酵素を含み“もどり”を起しやすい無晒し肉を用いてかまぼこの“もどり”に対する本酵素の阻害剤の添加効果を検討した (Fig. 4)。ここに使用した阻害剤はいずれも本酵素活性を強く阻害³⁾ (Table 2) するものであるが、本酵素活性をほぼ完全に失活させるため、それぞれの I_{50} 値の約 100 倍の濃度にコイの無晒し肉に加えた。なお、これらの阻害剤と本酵素とを十分に反応させるため塩ざり肉に阻害剤を加えた後、全ての試料を $3^{\circ}C$ に 1 晩放置し各温度で 2 時間加熱してかまぼこを調製した。図から明らかなように対照では $65^{\circ}C$ 加熱区が他の加熱区より圧出水分量が多いことから判るように弾力が損なわれていた。しかもロイペプチンを除きこれら阻害剤は“もどり”防止効果を示さなかつた。このように“もどり”が認められる条件下で阻害剤が効果を示さないという実験結果は本酵素が“もどり”に積極的に関与していないことを示唆しているものといえよう。ロイペプチンは部分的に“もどり”を防止したが、この効果は本酵素活性阻害よりは、未だ明らかでない本質的な“もどり”原因物質に対する作用とも考えられる。例えば、 $50-90^{\circ}C$ でのマアジ AM と筋形質たんぱく質との凝集沈殿³⁷⁾が報告されている。これは筋形質たんぱく質が原因であることを示唆しており、“もどり”現象の原因究明にあたり酵素以外のこのような要因も考慮する必要があると思われる。

終りに本実験に御協力いただいた富山大学薬学部戸塚栄子、鯉江みつ子両氏、および有益な御助言を賜った中井昇博士、三井健一郎氏、またロイペプチンおよびアンチパインを贈与された微生物化学研究所梅沢浜夫博士に厚く感謝する。

文 献

- 1) 岩田和士・小橋恭一・長谷純一: 本誌, **40**, 201-209 (1974).
- 2) K. IWATA, K. KOBASHI, and J. HASE: *This Bull.*, **39**, 1325-1337 (1973).
- 3) K. IWATA, K. KOBASHI, and J. HASE: *ibid.*, **40**, 189-200 (1974).
- 4) 岩田和士・小橋恭一・長谷純一: 本誌, **40**, 1043-1050, (1974).
- 5) B. M. ISELIN and R. SCHWYZER: *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1760-1766 (1961).
- 6) S. KONDO, K. KAWAKAMI, J. IWANAGA, M. HAMADA, T. AOYAGI, K. MAEDA, T. TAKEUCHI, and H. UMEZAWA: *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1896-1901 (1969).
- 7) T. AOYAGI, T. TAKEUCHI, A. MATSUZAKI, K. KAWAMURA, S. KONDO, M. HAMADA, K. MAEDA, and H. UMEZAWA: *J. Antibiotics*, **22**, 283-286 (1969).
- 8) H. SUDA, T. AOYAGI, M. HAMADA, T. TAKEUCHI, and H. UMEZAWA: *ibid.*, **25**, 263-266 (1972).
- 9) F. H. CARPENTER: in "Method in Enzymology" (ed. by C. H. W. HIRS), Vol. XI, Academic Press, New York and London, 1967, pp. 237.
- 10) M. KUNITZ: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291-310 (1947).
- 11) G. W. SCHWERT and Y. TAKENAKA: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 570-575 (1955).
- 12) National Formulary XII, Published by the American Pharmaceutical Association, 1965, pp. 95-96 and 417-418.
- 13) C. J. MARTIN, J. GOLUBOW, and A. E. AXELROD: *J. Biol. Chem.*, **234**, 294-298 (1959).
- 14) 岡田 稔: 東海水研報, **36**, 74-79 (1963).
- 15) K. IWATA and M. OKADA: *This Bull.*, **37**, 1191-1198 (1971).
- 16) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **56**, 109-116 (1968).
- 17) R. F. ITZHAKI and D. M. GILL: *Anal. Biochem.*, **9**, 401-410 (1964).
- 18) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

- 19) T. AOYAGI, S. MIYATA, M. NANBO, F. KOJIMA, M. ISHIZUKA, T. TAKEUCHI, and H. UMEZAWA: *J. Antibiotics*, **22**, 558-568 (1969).
- 20) H. IKEZAWA, K. YAMADA, T. AOYAGI, T. TAKEUCHI, and H. UMEZAWA: *ibid.*, **25**, 738-740 (1972).
- 21) J. G. DAVIS, J. C. ZAHNLEY, and J. W. DONOWAN: *Biochemistry*, **8**, 2044-2053 (1969).
- 22) R. E. FEENEY, F. C. STEVENS, and D. T. OSUGA: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1415-1418 (1963).
- 23) R. J. PEANASKY and M. LASKOWSKI: *ibid.*, **204**, 153-157 (1953).
- 24) F. C. WU and M. LASKOWSKI: *ibid.*, **235**, 1680-1685 (1960).
- 25) L. B. NANNINGA and M. M. GUEST: *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 542-551 (1964).
- 26) A. RIMSON, Y. SHAMASH, and B. SHAPIRO: *J. Biol. Chem.*, **241**, 5102-5107 (1966).
- 27) E. SHAW, M. MARES-GUIA and W. COHEN: *Biochemistry*, **4**, 2219-2224 (1965).
- 28) G. SCHOELLMANN and E. SHAW: *ibid.*, **2**, 252-255 (1963).
- 29) 小出 醇・松岡芳隆: 本誌, **37**, 927-935 (1971).
- 30) D. GIBSON and G. H. DIXON: *Nature*, **222**, 753-756 (1969).
- 31) H. H. SONNEBORN und G. PFLEIDERER: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 389-395 (1969).
- 32) 志水 寛・吉本晴樹・清水 亘: 本誌, **28**, 610-615 (1962).
- 33) 岡田 稔: 同誌, **30**, 255-261 (1964).
- 34) Y. MAKINODAN and S. IKEDA: *This Bull.*, **37**, 518-523 (1971).
- 35) I. TAKAGI: *ibid.*, **39**, 557-562 (1973).
- 36) I. TAKAGI: *ibid.*, **39**, 563-567 (1973).
- 37) 志水 寛・西岡不二男: 本誌, **40**, 231-234 (1974).