乾燥によるスケトウダラ塩漬肉中の筋原線維タンパク質の 変化と乾燥温度の影響

伊藤 剛, 北田 長義, 山田 典彦, 関 伸夫, 新井 健一

(1990年3月26日受付)

Influence of Dehydration Temperature on Change in Myofibrillar Protein of Cured Meat from Walleye Pollack

Tsuyosi Ito,*¹ Nagayosi Kitada,*² Norihiko Yamada,*² Nobuo Seki,*¹
and Ken-ichi Arai*¹

Salt concentration of minced meat from walleye pollack was fixed among 0.14~2.1 M by soaking in 3 M NaCl for various periods at 4°C. During the dehydration of the cured meat at 30, 40, and 50°C, inactivation of myofibrillar Ca-ATPase and formation of myosin heavy chain polymer (as estimated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) were investigated.

On dehydration of the uncured meat containing NaCl corresponding to 0.14 M, its myofibrillar Ca-ATPase activity and myosin heavy chain were hardly changed irrespective to dehydrating temperature. Whereas the cured meat containing 0.9 M NaCl was dehydrated at 30°C, myofibrillar Ca-ATPase was slowly inactivated with the accumulation of myosin heavy chain polymer having a relatively larger molecular size (HCn').

On dehydration, with the rise in temperature of over 40°C together with the increase in NaCl concentration of cured meat, myofibrillar Ca-ATPase was rapidly inactivated and the myosin heavy chain polymer (HCn') did not accumulate much.

著者らは先に、魚肉の塩蔵品および塩干品の製造過程を調節したり、また製品の品質を改良するために必要な知見を得ることを目的とし、スケトウダラの筋肉を塩漬するとき、¹⁾ また、この塩漬肉を乾燥する時に起こる各種性状の変化を検討した。その結果、塩漬によって魚肉中に塩が浸入し 0.8 M 以上になると、筋原線維タンパク質中のミオシン重鎖が減少し、それとともにミオシン重鎖の多量体が形成されること、¹⁾ また、この塩漬肉を加熱 (30°C) 乾燥するとミオシン重鎖の多量化反応がさらに進行する事実²⁾ が見いだされた。

魚肉中におけるミオシン重鎖の多量化反応は、すでにねり製品の製造における塩ずり肉の坐りの過程において起こることが知られており、³⁾ またねり製品のゲル弾性と強く関わることも示されている。⁴⁾ そこで、塩干品の製造過程におけるミオシン重鎖の多量化反応が、その品質に強く影響を及ぼす可能性はきわめて大きいものと考えられる。

本研究では、スケトウダラの筋肉を塩漬する時間を変

えて、塩濃度が 0.14~2.1 M の間の種々の塩漬肉を調製し、続いて 30~50°C の間の一定温で乾燥してミオシン重鎖に起こる変化を詳細に検討した。

実験方法

試料 新鮮なスケトウダラ (Walleye pollack) *Tera-gra chalcogramma* より背肉を採取し、約 1 cm×1 cm×3 cm の大きさに細切し、以下の塩漬および乾燥の実験に供した (以下本文中ではこれを単に魚肉と呼ぶ)。

魚肉の塩漬方法 魚肉を直径 1.59 cm の透析チューブに詰め、3 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) 溶液に対して 0~24 時間の間攪拌しながら透析し、これを塩漬とみなした。透析 (塩漬) 後、魚肉を透析チューブから取り出し、表面に付着している水分を濾紙を用いてできるだけ除去し、以下の実験に供した。なお以上の操作はすべて 4°C で行った。

塩漬肉の乾燥方法 塩漬した魚肉をステンレス製の金網にのせ、通風式の乾燥機 (Hi-TALL DRY OVEN M-

*¹ 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

*² 味の素株式会社食品開発研究所 (Laboratory of Food Products Development, AJINOMOTO Co., Inc., Kawasaki 210, Japan).

14, 太陽科学工業株式会社) 中に保持して 30~50°C の一定温度で乾燥した。

塩漬肉中の塩濃度の測定 塩漬肉を細碎し, その 1~2 g を精秤して 10~20 倍量の蒸留水を加えホモジナイズした。その懸濁液の 10 g を透析チューブに入れて蒸留水 90 g に対して 4°C で一晚透析し, その透析外液の比電導度 (ms/cm) を電導度計 (CM-20E, 東亜電波工業株式会社) により測定した。一方既知の濃度の NaCl 溶液について比電導度を求め, 両値の関係から作成した標準直線を用いて透析外液中の NaCl 濃度 (M) を求め, 塩漬肉中の塩濃度を算出した。

魚肉中の筋原線維 Ca-ATPase 活性の測定 加藤ら⁶⁾の方法に準じ, 細碎した魚肉 5 g を精秤し 25 ml の 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate (pH 7.5) (塩濃度の高い魚肉では代わりに 20 mM Tris-maleate (pH 7.5)) を加え, 充分に冷却しながら 1 分間ずつ 6 回ホモジナイズを繰り返し, 6,000×g で 10 分間遠心分離して沈殿を集め, 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate (pH 7.5) を加えて攪拌し, 遠心分離をする操作を数回繰り返して洗浄した後, 沈殿をガラス製ハンドホモジナイザーを用いて同上溶液に対して均質に懸濁させ, 全量を 100 ml として, 筋原線維 (Mf) 懸濁液とした。なお, この懸濁液のタンパク質濃度はビウレット法⁷⁾により比色定量した。また, Ca-ATPase (EC 3.6.1.3) は, 5 mM CaCl_2 , 60 mM または 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP および 0.2~0.3 mg/ml Mf の反応混液中で 25°C で反応させて, 生成した無機リン酸を比色定量⁷⁾して, 比活性 ($\mu\text{mol Pi/min}\cdot\text{mg}$ タンパク質) を求めた。

塩漬および乾燥肉タンパク質の SDS-尿素-メルカプトエタノール混液に対する可溶化と可溶化率の測定 沼倉らの採用した方法⁴⁾に従って, 細碎した塩漬肉および乾燥肉 0.4 g を精秤して, 7.5 ml の 8 M 尿素-2% SDS-2% 2-メルカプトエタノール-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液を加えて攪拌し, 100°C で 2 分間加熱後さらに室温で 20 時間攪拌して可溶化させた。なお, この溶液中のタンパク質は, 水で 10 倍に希釈した後, その一定量に等容量の 15% トリクロロ酢酸溶液を加えて室温で 30 分以上放置し, 遠心分離 (10,000×g, 20 分間) して沈殿させた。沈殿したタンパク質は風乾後, 1 N NaOH で溶解しビウレット法⁷⁾により比色定量した。また, 塩漬前の魚肉を同様に処理して可溶化させた溶液を 10,000×g, 20 分間遠心分離した後, 上清液中のタンパク質量も同様の方法により定量してこれを基準として可溶化率 (%) を求めた。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 SDS-尿素混液に可溶化した Mf タンパク質の 20 μg を, 電気泳動用試料として, Weber と Osborn の方法⁸⁾により 5%

Fig. 1. Change in weight of walleye pollack meat during dehydration at various temperatures.

Minced meat (1 cm×1 cm×3 cm) was dehydrated at 30 (○), 40 (△), or 50 (□) °C. The weight of minced meat was measured as a function of the time elapsed.

Fig. 2. Temperature dependence of rate constant for decrease in weight of cured meat by dehydration.

The minced meat was stuffed into cellulose dialyzing tubes (ϕ 1.59 cm) and soaked in 3 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0) solution at 4°C for 0 (○), 1 (△), 4 (□), and 14 (Δ) h. Thus, NaCl concentrations of minced meat before dehydration were found to be 0.14 (○), 0.9 (△), 1.8 (□), and 2.0 (Δ) M, respectively.

The first order rate constant (k_{dry}) for the decrease in weight of minced meat at an early stage of dehydration was calculated from the similar slope as shown in Fig. 1. The k_{dry} of minced meat with and without curing was calculated in the same manner.

アクリルアミドゲル¹⁾を用いた電気泳動に供した。染色はCoomassie Brilliant Blue Rにより行い、脱色は50%メタノール-7%酢酸で6~8時間、続いて7%酢酸でゲルの背景が透明になるまで暗所で行った。

筋原線維タンパク質のサブユニット成分の定量 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により分離した各タンパク質のサブユニット成分は、各々の染色強度を2波長クロマトスキャナー (CS-910型, 株式会社島津製作所) を用いて、640 nm と 700 nm の吸光値の差で測定した。なお、Mf タンパク質中の各サブユニット成分含量は、ゲル rod 上の全染色強度 (合計) に対する各成分の染色強度の相対値 (%) で表した。なお、SDS-尿素混液に対する可溶化率、および対照に比べて泳動ゲル上の全染色強度の回収率が低下する場合には、これらを補正して定量値を求めた。¹⁾

乾燥中の魚肉重量変化の測定 乾燥前の魚肉重量を基準とし、乾燥後におけるその重量を測定し百分率 (%) で表した。

結果と考察

乾燥に伴う魚肉重量の経時変化と乾燥温度の影響 乾燥するとき起こる魚肉重量の変化に対する乾燥温度の影響について検討した。まず、塩漬をする前の魚肉を30, 40, および 50°C の一定温度で乾燥した場合の魚肉重量の変化を測定し、乾燥前の重量を対照とした百分率 (%) で表した。その結果を Fig. 1 に示した。これによると、いずれの温度で乾燥した場合にも、魚肉重量は初期に速く後期は遅い二段階の一次反応に従って減少し、また乾燥温度が高いほどその速度が大きくなる傾向を示した。次に塩漬時間を変えて異なる塩濃度となった魚肉を乾燥させた場合の変化について検討した。結果は図示しないが、魚肉重量の減少はやはり初期は速く後期が遅い二段階の一次反応に従い、その速度は同じく乾燥温度が高いほど大きくなる傾向が示された。すなわち 30°C では 24 時間後、40°C では 10 時間後、50°C では 4 時間後に魚肉重量は最小値に近づき、ほぼ 1/5 の重量まで減少した。言い換えれば魚肉中の塩濃度は約 5 倍に濃縮

Fig. 3. Change in myofibrillar Ca-ATPase activity of cured meat during dehydration at various temperatures.

The minced meat was soaked in NaCl solution for various time intervals as in Fig. 2 and dehydrated at 30 (A), 40 (B), or 50 (C) °C. During dehydration, a portion of the minced meat was taken out and myofibril suspensions were prepared quantitatively. Myofibrillar Ca-ATPase assay was carried out according to the method of N. Katoh *et al.* (Ref. 5).

NaCl concentrations of minced meat before dehydration were given to be 0.14 (○), 0.9 (△), and 1.4 (□) M, respectively.

されたことになる。そこで、乾燥初期の速い減少の速度定数 (k) を算出し、その対数値を乾燥温度 (絶対温度) の逆数に対してプロットした (Arrhenius plot)。その結果を Fig. 2 に示したが、これによると、同じ温度における乾燥初期の速度は、魚肉中の塩濃度が異なっていて

Fig. 4. Change in content of myofibrillar protein subunits of uncured meat during dehydration at various temperatures.

The minced meat containing 0.14 M KCl (uncured) was dehydrated at 30 (A), 40 (B), and 50 (C) °C. A portion of minced meat was taken out and solubilized into 7.5 ml of SDS-8 M urea-2% 2-mercaptoethanol-20 mM Tris-HCl (pH 8.0) by heating at 100°C for 2 min, followed by continuous stirring for 20 h at room temp. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min, protein concentration of the supernatant was determined by the biuret method. The supernatant containing 20 μ g of protein was applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using 5% acrylamide gel. The protein components on the gel were stained with Coomassie Brilliant Blue R. The determination of content of each protein component was conducted by densitometry.

(□); slower moving components relative to myosin heavy chain: myosin heavy chain polymer (HCn).

(○); myosin heavy chain (HC).

(△); moving components between myosin heavy chain and actin: unknown component (HC > x > A).

も、重量の減少速度から見る限りほぼ一致しており、前報²⁾で示した 30°C における乾燥の場合と同じ結果が他の温度でも成り立つことを示した。また温度が高いほど乾燥速度は大きくなり、その対数と乾燥温度 (絶対温度) の逆数の間には直線関係が成り立っている。

乾燥に伴う魚肉中の筋原線維 Ca-ATPase 全活性の経時変化と乾燥温度の影響 異なる温度で乾燥するとき起こる魚肉中の Mf タンパク質の変性を Ca-ATPase 活性を指標として検討したが、前報²⁾で述べたように、乾燥が進むと魚肉から Mf 懸濁液を定量的に調製できなくなるため、乾燥のきわめて初期の間においてのみ測定が可能であった。測定した結果を Fig. 3 に示したが、これによるとまず 30°C で乾燥した場合 (A)、魚肉中の塩濃度が 0.14~1.4 M のいずれの場合も、Mf Ca-ATPase 活性は一次反応に従って低下すること、また魚肉中の塩濃度が高くなるほど活性の低下が大きくなることが示さ

Fig. 5. Change in content of myofibrillar protein subunits of cured meat containing 0.9 M NaCl during dehydration at various temperatures.

The minced meat was soaked in 3 M NaCl solution for 1 h as in Fig. 2 and dehydrated at 30 (A), 40 (B), and 50 (C) °C. The NaCl concentration of minced meat before dehydration was found to be 0.9 M. Solubilization of minced meat with SDS-urea and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were conducted as in Fig. 4. The determination of content of each protein component was also conducted as in Fig. 4.

The symbols are the same as in Fig. 4.

れているが、これは既に報じた。²⁾ 次に、40 および 50°C で乾燥した場合 ((B) と (C)) を見ると、乾燥の初期 (40°C では 1~2 時間以内、50°C では 0.5~1 時間以内) を除き、その後は急速に失活した。これはおそらく、40°C 以上の温度ではスケトウダラ筋肉中の Mf タンパク質の変性が急激で、凝集し不溶化が進行するためであるように考えられる。なお、凝集が起こる原因が加熱によるのか、または塩濃度によるのかは断定できない。

乾燥に伴う塩漬肉中の筋原線維タンパク質のサブユニット成分の経時変化と乾燥温度の影響 異なる温度で乾燥するとき起こる魚肉中の Mf タンパク質のサブユニット成分の組成変化について検討した。すなわち、30~50°C の間の温度で乾燥中の塩漬肉から前述したとおりに経時的にその一部を取り出し、SDS-尿素混液に対して溶解して、SDS-PAGE 法に供し各タンパク質サブユニット成分を比色定量した。その結果、前報²⁾ において

示した 30°C における乾燥の場合と同様に、40°C や 50°C においても乾燥に伴いサブユニット成分が、大きく変化するが、特にミオシン重鎖 (HC), 移動度が小さくミオシン HC の多量体と考えられる成分²⁾ (HCn), およびミオシン HC より移動度が大きくアクチン (A) より小さい未知の成分 ($HC > x > A$) の三種の成分が大きく変化し、他の成分はほとんど変化しなかった。そこで上記三種の成分に焦点をおき、その変化を Fig. 4~7 に示した。

まず、塩漬をする前の魚肉 (塩濃度は 0.14 M に相当している) の場合は、Fig. 4 に示すように、相対的に多量 (30%) のミオシン HC と少量 (それぞれ 10% および 4%) の (HCn) と ($HC > x > A$) を含んでいるが、これを 30°C で乾燥する場合、24 時間後までの間両成分には大きな変化は認められなかった。また、40 および 50°C で乾燥する場合にはミオシン HC がわずかに減少してそ

Fig. 6. Change in content of myofibrillar protein subunits of cured meat containing 2.1 M NaCl during dehydration at various temperatures.

The minced meat was soaked in 3 M NaCl solution for 8 h as in Fig. 2 and dehydrated at 30 (A), 40 (B), and 50 (C) °C. The NaCl concentration of minced meat before dehydration was found to be 2.1 M. Solubilization of minced meat with SDS-urea and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were conducted as in Fig. 4. The determination of content of each protein component was also conducted as in Fig. 4.

The symbols are the same as in Fig. 4.

Fig. 7. Change in content of myofibrillar protein subunits of cured meat containing 2.1 M NaCl during dehydration at various temperatures.

The minced meat was soaked in 3 M NaCl solution for 14 h as in Fig. 2 and dehydrated at 30 (A), 40 (B), and 50 (C) °C. The NaCl concentration of minced meat before dehydration was found to be 2.1 M. Solubilization of minced meat with SDS-urea and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis were conducted as in Fig. 4. The determination of content of each protein component was also conducted as in Fig. 4.

The symbols are the same as in Fig. 4.

他の2成分がわずかに増加する傾向が認められるが、いずれにしても大きな変化は起こらなかった。

次に、塩漬により魚肉中の塩濃度が0.9 Mになった魚肉を乾燥した場合の結果をFig. 5に示した。これによると、まず塩漬する前の魚肉中の含量 (Fig. 4の乾燥前の含量に相当する) に比べて、魚肉中のミオシン HC、(HCn)、および $(HC > x > A)$ の含量は塩漬中にはほとんど変化していないことが示された。しかし、30~50°Cの間の温度で乾燥すると、その初期にミオシン HC が急激に減少し、それに対応して (HCn) と $(HC > x > A)$ の成分が増加する傾向を示している。特に30°Cで乾燥する場合は、その初期には (HC) が急激に減少し、それに伴って (HCn) が一旦多量に増加した後、減少する傾向を示した。なおその他の成分の変化は認められなかった。この (HCn) の減少は、既に報じた報告のように、ゲル中へ侵入できない程の大きなサイズのミオシン HC 多量体 (以下 (HCn') と表す) 成分が生成したことを示唆するものである。一方40および50°Cで乾燥する場合は、その初期にミオシン HC が減少して、(HCn) が増加するものの、その生成量は余り多くない。また30°Cの場合とは異なり、増加した後減少する傾向も示さなかった。それゆえ、40°C以上の温度で乾燥する場合には、形成されるミオシン HC 間の結合は、SDS-尿素混液中で解離するような弱い結合であるために、みかけ上変化が少なかったものと考えられる。

また塩漬を8時間行い魚肉中の塩濃度が2.1 Mとなった魚肉を乾燥した場合の結果をFig. 6に示した。これによると、まず塩漬前の魚肉中の含量を基準とすると、魚肉中のミオシン HC 量は乾燥前の値 (30% 前後) からその約7割 (20% 程度) まで減少し、代わりに (HCn) が当初の値 (10%) からその2倍量 (20% 以上) に増加していること、続いてこの塩漬肉を乾燥すると、30~50°Cのいずれの温度の場合もその初期にミオシン HC がさらに急激に減少することが示されている。しかるにその減少に対応するような他の成分の増加は認められず、特に30°Cの場合には (HCn) 成分でさえもむしろ減少する傾向が示された。言い換えればこのとき泳動ゲル上の染色強度の総計は減少しており、これは、Fig. 5の場合と同様に泳動ゲル中に侵入できないほど大きなサイズの (HCn') 成分が増加していること、そしてその量は約20%に相当することを示している。一方、40および50°Cで乾燥する場合には、ミオシン HC の減少に伴い $(HC > x > A)$ 成分が極めてわずかに増加するものの、(HCn) 成分もほとんど増加しないので、同じく泳動ゲル中に侵入できないような (HCn') 成分が生成していることを示している。

さらに、塩漬を14時間行い塩濃度が2.1 Mとなった

魚肉を乾燥させた結果をFig. 7に示した。この場合には、まず魚肉中のミオシン HC は塩漬中に既に著しく減少して、乾燥前の値 (30%) からその1/6の5%程度にまで減り、代わりに (HCn) が増加して当初の10%から20ないし30%に達することを示したが、これらの成分はこの魚肉を乾燥してもこれ以上ほとんど変化しなかった。すなわち、いずれの温度で乾燥してもミオシン HC はきわめてわずかに減少、また (HCn) も30°Cではやはりわずかに減少し、40°Cや50°Cの場合はほとんど変化しなかった。なお、特に30°Cで乾燥した魚肉の場合は SDS-尿素混液に対する溶解性が徐々に低下する傾向を示し、同時に泳動ゲル上の染色強度の総計が顕著に減少する傾向をも示した。したがってこの場合は SDS-尿素混液にも可溶化しないほどに巨大なミオシン HC の多量体 (これを (HCn'') と表す) が生成したことを強く示唆している。この成分についても前の報告⁹⁾で述べたが、なお、その生成量は約20%に相当している。一方、40°Cおよび50°Cで乾燥した魚肉の場合には、乾燥肉の SDS-尿素混液に対する溶解度は100%であり、泳動ゲル上の染色強度の合計もほとんど減少しないので、30°Cで乾燥する場合のような (HCn') および (HCn'') 成分は生成していない。

以上述べた結果から、塩干品中におけるミオシン重鎖の多量化反応は、魚肉の塩漬条件と塩漬肉の乾燥条件 (処理温度および時間など) によって輻輳した影響を受けることが明らかになった。なお、ミオシン重鎖の多量化反応は塩漬肉の坐り過程においても起こり、ねり製品のゲル弾性に寄与している事実が既に知られている⁹⁾ので、この反応の進行状況が塩干品の品質にも貢献している可能性はきわめて大きいものと推定される。

一方、魚肉を構成している筋原線維タンパク質は、その Ca-ATPase 活性を指標とすると、魚類の棲息水温に適応した安定性を示し、魚種によって著しく異なることが知られている。¹⁰⁾したがって、塩干品の製造において魚肉の乾燥温度が製品の品質に大きく影響を及ぼすことが強く予想されるものである。

本研究で得た塩干品の品質を著者が官能的に判定した結果によると、本研究の実験条件の中では、まず魚肉を塩漬して塩濃度を0.9~1.8 Mの間に調整した後、30°Cで乾燥した場合に比較的よい製品が得られ、その肉質は透明感があり弾力のある食感を保有していた。この乾燥条件下では塩漬肉中の筋原線維タンパク質の変性は比較的緩慢に進み、乾燥初期の数時間の間は均質な筋原線維懸濁液の調製が可能であり、水分の除去と対応するように Ca-ATPase 活性がゆっくりと低下するのが特徴であった。一方、40°C以上で乾燥した場合には、肉質は透明感を失い白濁したもちい感じの製品となった。加えて、

塩漬時の時間が長びいたり、塩濃度がより高くなった魚肉を乾燥した場合にもよい製品が得られなかったが、この条件下では魚肉中の筋原線維タンパク質の変性がきわめて速く、水分の除去が行われる以前に **Ca-ATPase** 活性が激減してほぼ消失してしまうのが特徴であった。

塩干品の中に見いだされたミオシン重鎖の多量体は、ねり製品中のそれとおそらく同じであり、ミオシン重鎖間の交差結合、またはほどけ-絡み合いに基づくいわゆる網状構造の本体に相当すると考えられる。それゆえ、製品の生産過程におけるミオシン重鎖の多量化反応と、それに影響を及ぼす要因を明らかにし、意図的にその調節を計ることは製品の生産過程と品質の制御を計るために必要な技術の一端となるように思われる。

文 献

- 1) 伊藤 剛, 北田長義, 山田典彦, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, **56**, 687-693 (1990).
- 2) 伊藤 剛, 北田長義, 山田典彦, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, **56**, 999-1006 (1990).
- 3) 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: 日水誌, **51**, 1559-1565 (1985).
- 4) 沼倉忠弘, 溝口 竜, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, **55**, 1083-1090 (1989).
- 5) 加藤 登, 内山 均, 塚本志郎, 新井健一: 日水誌, **43**, 857-867 (1977).
- 6) A. G. Gornall, C. T. Bardawill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 7) G. Gomori: *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955-960 (1942).
- 8) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 9) 西本真一郎, 橋本昭彦, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一: 日水誌, **53**, 2011-2020 (1987).
- 10) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一: 日水誌, **48**, 671-684 (1982).