ヤマトシジミ・リゾチームの精製と性質

宮内 浩二, 松宮 政弘, 望月 篤

(1999年4月21日受付)

Purification and Characterization of Lysozyme from
Brackishwater Clam *Corbicula japonica*

Kouji Miyauchi,* Masahiro Matsumiya,* and Atsushi Mochizuki*

Lysozyme was purified from brackishwater clam *Corbicula japonica* by sequential procedures with ammonium sulfate fractionation, and CHITOPPEARL BASIC BL-01 affinity, Hydroxyapatite, S-Sepharose Fast Flow, and CM-TOYOPPEARL 650S column chromatographies.

The purified enzyme showed a single protein band on polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and its molecular weight was estimated to be 12,000 by SDS-PAGE. Optimum pH of the enzyme was 4.8 toward *Micrococcus lysodeikticus* cells. The optimum temperature was 70°C. The enzyme was stable in the range of pH 3.0-6.8 and 20-90°C, respectively. The specific activity of the enzyme toward *M. lysodeikticus* cells was 256-fold higher than that of hen egg white lysozyme.

The N-terminal amino acid sequence and amino acid composition of the enzyme were not similar to those of hen egg white lysozyme, suggesting a genetical difference of both enzymes.

キーワード: リゾチーム, 貝類, ヤマトシジミ, 精製, 性質, アミノ酸組成

リゾチーム (EC 3.2.1.17) は細菌細胞壁の *N*-アセチルムラミン酸と *N*-アセチルグルコサミン間の β -1, 4 結合を切断する溶菌酵素として生物界に広く分布していることが知られている。^{1,2)} 本酵素は比較的低分子量であるため取り扱いおよび精製が容易なことから、その生理活性から、比較生化学および利用学的観点において注目され、広範の生物種について検討されている。特に鳥類の卵白リゾチームに関しては詳細な研究が進められており、^{3,4)} 容易に大量の精製標品が得られるニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) については構造と機能の関連をはじめ、その性質が最も詳細に解明されている酵素の一つといえる。水生生物のリゾチームに関する報告も比較的多く、魚類の血液、粘液およびその他の組織で存在が確認され、^{5,6)} アユ体表粘液⁷⁾ およびニジマス腎臓⁸⁾ よりリゾチームが精製されている。特に、ニジマス腎臓リゾチームについては全アミノ酸配列が決定されている。⁹⁾ 貝類についても、イガイ類、¹⁰⁻¹²⁾ マガキ¹²⁾ およびその他の数種貝類¹³⁾ におけるリゾチームの分布およびいくつかの性質が報告されており、ヨーロッパイガイ、¹⁰⁾ ホタテイガイ廃棄物、¹⁴⁾ マシジミ¹³⁾ およびサザエ¹⁵⁾ では精製酵素を用いてその性質が比較的详细に検討されている。

これらの報告によると、貝類リゾチームは HEWL に比べ安定 pH 範囲が狭い、などの幾つかの特性を有している。特に、ヨーロッパイガイ¹⁰⁾ およびサザエ¹⁵⁾ のリゾチームの分子量がそれぞれ 18,000 および 17,000 と HEWL のそれに比べて大きく、分子性状の相異が強く示唆されている。そこで、本研究では貝類リゾチームの特性を明確にするため、シジミ類の主要種であるヤマトシジミのリゾチームを精製し、その性質を HEWL と比較検討した。

実験方法

実験材料 ヤマトシジミ *Corbicula japonica* は、1997年11月18日に東京中央卸売市場にて購入したものを -20°C で一ヶ月間保存し、適宜実験に供した。HEWL および *Micrococcus lysodeikticus* の乾燥菌体は、SIGMA CHEMICAL 製を、またエチレングリコールキチンは、生化学工業株式会社製を用いた。

酵素活性の測定 リゾチーム活性は Miura *et al.*¹⁶⁾ と同様に、*M. lysodeikticus* の乾燥菌体を基質とし、HEWL (SIGMA CHEMICAL, L-6876) を標準リゾチームとして使用し測定した。すなわち、10 mM リン酸

* 日本大学生物資源科学部 (College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan).

塩緩衝液 (pH 6.2) 中で 37°C, 10 分間反応させ, 得られた吸光値を予め作成した HEWL の検量線に当てはめ, 相当する HEWL 量 (mg) に換算して表した。なお, pH および温度に関する実験については, 最高の活性を 100 として相対活性 (%) で表した。グリコールキチン分解活性は Imoto and Yagishita¹⁷⁾ の方法に, コロイダルキチンおよび *p*-ニトロフェニル *N*-アセチル- β -D-グルコサミニド分解活性は Ohtakara¹⁸⁾ の方法に準拠して測定し, 活性は 1 分間に遊離する *N*-アセチル- β -D-グルコサミニド (GlcNAc) の μ mol で表した。

電気泳動 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は pH 4.0, 20% スラブゲルを用い, Reisfeld *et al.*¹⁹⁾ の方法により行った。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)-PAGE は, Pharmacia Biotech 製 PhastGel Homogeneous 20 を用いて行った。なお, 泳動後のタンパク質は Coomassie Brilliant Blue R-250 により可視化し

た。

その他の分析 タンパク質はウシ血清アルブミンを標準タンパク質とする Lowry *et al.*²⁰⁾ の方法により定量した。アミノ酸組成は 6 N HCl 中, 110°C, 24 時間加水分解し, AA pak Li カラム (日本分光社製) を用いた HPLC により分析した。なお, Cys は過ギ酸酸化法²¹⁾ により処理し, システイン酸として定量した。N 末端部分のアミノ酸配列は還元ピリジルエチル化後, ペプチドシーケンサー 447A/120A (PE Applied Biosystems) により分析した。

リゾチームの精製方法 殻を除いたヤマトシジミのむき身 (内臓を含む) を 5 倍容量の 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.2) とともにウルトラタラックス T25・ホモジナイザー (Janke and Kunkel 製) を用いて 20,000 rpm で 2 分間ホモジナイズした。これを 10,000 $\times g$ で 20 分間遠心分離し, 得られた上澄液を粗酵素液とした。この

Fig. 1. Chromatographies of lysozyme from *Corbicula japonica* on CHITOPPEARL BASIC BL-01 (A), Hydroxyapatite (B), S-Sepharose Fast Flow (C), and CM-TOYOPEARL 650S column (D).

The crude extraction which was added sodium chloride to final concentration of 1 M was applied to a CHITOPPEARL BASIC BL-01 affinity column (3 $\times$ 10 cm). After washing with 1 M sodium chloride in 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), absorbed protein was eluted with 0.1 M acetic acid. Lysozyme active fractions were pooled, dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.8), and charged a Hydroxyapatite column (1.5 $\times$ 15 cm). The column was washed with the same buffer and then the enzyme was eluted with 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8). Lysozyme active fractions were combined, dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.0), and applied to cation-exchange chromatography on a S-Sepharose Fast Flow column (1.2 $\times$ 20 cm). The column was washed with the same buffer and subsequently the enzyme was eluted with a linear gradient of sodium chloride (0–0.3 M) in the buffer for 400 ml. The lysozyme active fractions were collected, desalted, and charged a CM-TOYOPEARL 650S column (1 $\times$ 10 cm). After washing with 10 mM phosphate buffer (pH 6.0), absorbed protein was eluted with a linear gradient of sodium chloride (0–0.15 M) in the buffer for 200 ml. The eluted protein was monitored by absorbance at 280 nm (—●—) and lysozyme activity for *M. lysodeikticus* cells (---○---) was measured at 37°C and pH 6.2.

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of *C. japonica* lysozyme.

Native-PAGE was performed at pH 4.0 using a 20% polyacrylamide slab gel (A). SDS-PAGE was performed using a Phast Gel Homogeneous 20 (Pharmacia Biotech) (B). Lanes: 1, *C. japonica* lysozyme (reduced); 2, *C. japonica* lysozyme (unreduced); 3, molecular weight marker.

粗酵素液に硫酸を70%飽和まで加え、2時間静置後、 $10,000\times g$ で20分間遠心分離した。得られた沈殿に少量の10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) を加えて溶解し、同緩衝液に対して一夜透析し、硫酸を除去した。これを $10,000\times g$ で20分間遠心分離し、得られた上澄液に塩化ナトリウムを1 M となるように添加した。これを1 M 塩化ナトリウム含有10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) であらかじめ平衡化したキトパールベーシック BL-01 アフィニティーカラムに付した。同緩衝液で非吸着画分を洗浄した後、吸着画分を0.1 M 酢酸により溶出させた。吸着画分に認められたリゾチーム活性画分を、10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) に対して透析し、同緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに重層した。非吸着画分を同緩衝液で洗浄した後、0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) で吸着画分を溶出した。活性画分を10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) に対して透析し、同緩衝液で平衡化したS-セファロース Fast Flow カラムに吸着させた。非吸着画分を溶出した後、吸着画分を同緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を0-0.3 M (全容量400 ml) に直線的に増加させて溶出した。活性画分を集め、同緩衝液に透析した後、同緩衝液で平衡化したCM-トヨパール 650S カラムに供し、同緩衝液中の塩化ナトリウム濃度0-0.15 M (全容量200 ml) の直線的濃度勾配により吸着画分を溶出した。

結果および考察

リゾチームの精製 ヤマトシジミむき身76 gより調製した70%硫酸飽和画分をキトパールベーシック BL-

01 アフィニティーカラムに付した結果をFig. 1Aに示す。リゾチーム活性は非吸着画分には検出されず、吸着画分にはのみ認められた。活性画分 Fraction Number (Frac. No.) 48-54を集め、ヒドロキシアパタイトカラムに付したところ (Fig. 1B)、活性画分は強く吸着し、少量の不純タンパク質が除去された。引き続き0.2 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.8) により溶出された活性画分 (Frac. No. 46-50) をS-セファロース Fast Flow カラムに付した (Fig. 1C)。非吸着画分には活性は認められず、多量の不純タンパク質が除去された。得られた活性画分 (Frac. No. 40-45) をさらにCM-トヨパール 650S カラムに付した (Fig. 1D)。その結果、リゾチーム活性はNaCl濃度0.09 M付近および0.11 M付近の2つのピークに分離された。このうち主要成分である前者のピークを集めPAGEにより純度を検定したところ、Fig. 2(A)に示すように単一バンドが認められた。この結果から、本リゾチーム画分はほぼ単一までに精製されたものと判断し、ヤマトシジミ・リゾチームの精製酵素として以降の実験に用いた。なおTable 1に示すように、ヤマトシジミリゾチームは粗抽出液と比べて約2,900倍に精製され、回収率は16%であった。

ヤマトシジミ・リゾチームの酵素学的性質 ムラサキイガイ¹²⁾ マガキ¹²⁾ およびマシジミ¹³⁾ のリゾチームの至適pHはHEWLなどに比べて低いとされている。そこで、ヤマトシジミ・リゾチームの *M. lysodeikticus* 菌体に対する活性をpH 2.4-8.0で測定した。その結果、Fig. 3に示すように、ヤマトシジミ・リゾチームは同時に測定したHEWLに比べて、狭いpH範囲で活性を示

Table 1. Purification of *Corbicula japonica* lysozyme

Step of purification	Total activity* (mg)	Total protein (mg)	Specific activity (mg/mg of protein)	Purification (fold)	Activity yield (%)
Crude extract	192	2,160	0.088	1	100
Ammonium sulfate fractionation (0-70%)	140	996	0.141	1.60	73
CHITOPPEARL BASIC BL-01	98	6.97	14.1	160	51
Hydroxyapatite	40	0.705	56.7	644	21
S-Sepharose Fast Flow	36	0.531	67.8	770	19
CM-TOYOPEARL 650S	30	0.117	256	2,909	16

* Activity is defined as mg of standard HEWL (SIGMA CHEMICAL CO. L-6876) corresponding to activity of a lysozyme assayed at pH 6.2 and 37°C for 10 min.

Fig. 3. Effect of pH on activities of *C. japonica* lysozyme (—●—) and hen egg white lysozyme (HEWL) (---○---).

Lysozyme activity for *M. lysodeikticus* cells was measured with McIlvaine buffer (pH 2.4–8.0) at 37°C for 10 min.

した。特に, pH 6.0–8.0 の中性域での活性が HEWL に比べて著しく低いことが特徴であった。この pH と活性との関係から求められる至適 pH は 4.8 であり, ここで求められた HEWL の 6.8, ムラサキイガイおよびマガキの 5.5¹²⁾ に比べて低く, マシジミ・リゾチームの 4.6¹³⁾ に類似していた。次にヤマトシジミ・リゾチームの最適温度を調べるため *M. lysodeikticus* 菌体に対し

Fig. 4. Effect of temperature on activities of *C. japonica* lysozyme (—●—) and HEWL (---○---).

Lysozyme activity for *M. lysodeikticus* cells was measured at 20–90°C and pH 6.2 for 10 min.

pH 6.2, 20–90°C で 10 分間反応させた。そのときの活性と温度の関係を Fig. 4 に示す。ヤマトシジミ・リゾチームは 70°C で最高活性を示し, 同時に測定した HEWL の 60°C およびマシジミ・リゾチームの 65°C¹³⁾ に近い値であった。また, HEWL に比べ, 80–90°C の高温においても比較的高い活性を示した。この結果はムラサキイガイ¹²⁾ およびマシジミ¹³⁾ のリゾチームにおいても観察されている。さらにヤマトシジミ・リゾチーム

の基質特異性を検討するため、リゾチームの基質である *M. lysodeikticus* およびグリコールキチン、エンド型キチナーゼの基質であるコロイダルキチンおよびエキソ型キチナーゼの基質である *p*-ニトロフェニル *N*-アセチル- β -D-グルコサミニドに対する活性についても測定した。その結果、Table 2 に示すように、ヤマトシジミ・リゾチームは *M. lysodeikticus* 菌体を HEWL の 256 倍強く分解したが、HEWL が分解するグリコールキチンは分解しなかった。また、コロイダルキチンおよび *p*-ニトロフェニル *N*-アセチル- β -D-グルコサミニドはまったく分解しなかった。このことから、ヤマトシジミ・リゾチームは HEWL と基質特異性が明確に異なるものと判断された。また、ヤマトシジミ・リゾチームの活性におよぼす各種金属塩の影響を検討した結果を Table 3 に示す。ヤマトシジミ・リゾチームは HEWL および他のリゾチームと同様に Fe^{3+} および Hg^{2+} などの重金属により阻害され、アルカリおよびアルカリ土類金属によりほとんど影響を受けなかった。また、ムラサキイガイ・リゾチーム¹²⁾において阻害が報告されている Zn^{2+} では、ヤマトシジミ・リゾチームは HEWL と同様にほとんど阻害されなかった。次に、ヤマトシジミ・リゾチームの活性に及ぼす各種化合物の影響を既報の方法^{12,13)}に準じて比較検討した。この結果、Table 4 に示すように、全体的な影響プロフィールには他のリゾチームと顕著な差異はなかった。すなわち、ヤマトシジミ・リゾチームはムラサキイガイ¹²⁾およびマシジミ¹³⁾のリゾチームでの報告と同様に、ヨウ素および過マンガン酸カリウムで顕著に阻害され、その他の化合物により明確な影響を受けなかった。しかし、HEWL および他のリゾチームでは認められなかったシアン化カリウムによる弱い阻害が観察されたことと、2-メルカプトエタノールによ

Table 2. Comparison of substrate specificity of *C. japonica* lysozyme and HEWL

Substrate	Specific activity (activity/mg of protein)	
	<i>C. japonica</i> lysozyme	HEWL
<i>M. lysodeikticus</i> * ¹	256	1
Glycol chitin* ²	N.D.	0.23
Colloidal chitin	N.D.	N.D.
<i>p</i> -Nitrophenyl <i>N</i> -acetyl- β -D-glucosaminide	N.D.	N.D.

*¹ Activity is defined as mg of standard HEWL corresponding to activity of a lysozyme assayed for 10 min at pH 6.2 and 37°C.

*² Activity is defined as μ mole of reducing sugars as *N*-acetyl-D-glucosamine per 1 min at pH 4.0 and 37°C. N.D., not detectable at pH 4.0, 6.0, and 8.0.

りまったく阻害されなかったことが特徴的であった。

ヤマトシジミ・リゾチームのタンパク質化学的性質
ヤマトシジミ・リゾチームの SDS-PAGE の結果を Fig. 2(B) に示す。ヤマトシジミ・リゾチームは還元および非還元条件下においてほぼ同一移動度の単一バンドを示し、他種リゾチームと同様に単一ポリペプチドから構成されていると判断された。また、標準タンパク質の移動度との比較から、本酵素の分子量は約 12,000 と見積もられた。ホタテガイ廃棄物から得られたリゾチーム

Table 3. Effect of metal salts on activities of *C. japonica* lysozyme and HEWL

Metal salt (1 mM)	Relative activity (%)	
	<i>C. japonica</i> lysozyme	HEWL
None	100	100
NaCl	101	101
KCl	100	100
FeCl_2	95	87
FeCl_3	15	9
MgCl_2	110	105
BaCl_2	107	106
MnCl_2	49	67
CaCl_2	107	104
HgCl_2	14	36
CdCl_2	61	87
PbCl_2	63	80
CuCl_2	62	85
ZnCl_2	100	111
NiCl_2	98	87

Table 4. Effect of various compounds on activities of *C. japonica* lysozyme and HEWL

Compound	Concentration (mM)	Relative activity (%)	
		<i>C. japonica</i> lysozyme	HEWL
None	0	100	100
EDTA	1.0	100	97
Iodoacetic acid	1.0	100	90
Nitrilotriacetic acid	1.0	107	85
Potassium permanganate	0.1	75	72
Potassium permanganate	1.0	3	3
Iodine	0.1	48	15
KCN	1.0	80	98
2-Mercaptoethanol	1.0	99	81
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	1.0	98	95

の 10,000,¹⁴⁾ サザエの 17,000¹⁵⁾ およびヨーロッパイガイの 18,000¹⁰⁾ と異なり, むしろ HEWL の 14,000 に近い値であった。次に, 本酵素の pH 安定性を見るため, 各 pH (2.4–8.0) で 37°C に 30 分間保持した後, pH 6.2, 10 分間で活性を測定した結果を Fig. 5 に示す。ヤマトシジミ・リゾチームは HEWL に比べ安定な pH 範囲はやや狭かった。すなわち, HEWL は測定したいずれの pH でも高い安定性を示したのに対し, ヤマトシジミ・リゾチームは pH 3.0–6.8 の範囲で安定であったが, pH 3.0 以下および 7.0 以上で明確に残存活性の減少を示した。しかし, pH 2.4 および 8.0 においても 60% 以上の活性を保持した。また, 本酵素の pH 安定性は, pH 2.5 付近の狭い pH 範囲でのみ安定なマシジミ・リゾチーム¹³⁾ のそれに比べて広がった。さらに, ヤマトシジミ・リゾチームの温度安定性を検討するため, pH 4.8 で 20–90°C に 30 分間保持した後, pH 6.2 で測定した残存活性を Fig. 6 に示す。ヤマトシジミ・リゾチームの残存活性は同条件で測定した HEWL と同様, 温度の上昇とともに緩やかに低下した。しかし, 両酵素ともに 90°C において 80% の活性を保持し, 90°C, 30 分間保持後の残存活性が 50% であるマシジミ¹³⁾ のリゾチー

Fig. 5. Effect of pH on stabilities of *C. japonica* lysozyme (—●—) and HEWL (---○---).

The activity for *M. lysodeikticus* cells was measured at 37°C and pH 6.2 after preincubation at various pHs (2.4–8.0) for 30 min.

Fig. 6. Effect of temperature on stabilities of *C. japonica* lysozyme (—●—) and HEWL (---○---).

The activity for *M. lysodeikticus* cells was measured at 37°C and pH 6.2 after preincubation at various temperatures (20–90°C) in pH 4.8 for 30 min.

Table 5. Amino acid compositions of *C. japonica* lysozyme and HEWL

Amino acid	mole (%)	
	<i>C. japonica</i> lysozyme	HEWL
Asp	8.0	16.2
Thr	3.5	5.2
Ser	12.1	6.9
Glu	14.6	4.2
Pro	2.9	1.7
Gly	17.4	9.7
Ala	9.4	9.9
Val	4.7	4.3
Cys*	5.1	11.0
Met	1.7	1.7
Ile	2.8	5.1
Leu	3.8	6.4
Tyr	0.3	2.3
Phe	0.8	2.4
Lys	3.3	4.8
His	4.7	0.9
Arg	4.9	7.3

* Determined as cysteic acid after performic acid oxidation.

		1								10					14
<i>C. japonica</i>		Y	A	P	G	M	V	S	Q	A	-	L	D	-	I
Hen egg white		K	V	F	G	R	C	E	L	A	A	A	M	K	H
RN pheasant egg white	G	K	V	Y	G	R	C	E	L	A	A	A	M	K	R
Rainbow trout kidney I		K	V	Y	D	R	C	E	L	A	R	A	L	K	A
Hoatzin stomach I		E	I	I	P	R	C	E	L	V	K	I	L	R	E
Possum milk		S	K	M	K	K	C	E	F	A	K	I	A	K	E

Fig. 7. Comparison of N-terminal amino acid sequences of lysozymes.
—, not determined.

ムに比べ、温度安定性は比較的高いものであった。

ヤマトシジミ・リゾチームのアミノ酸組成を Table 5 に示す。ヤマトシジミ・リゾチームは HEWL に比べ、Ser, Glu および Gly 含量が高く、Asp および Cys 含量が低かった。また、今回得られたヤマトシジミ・リゾチームの N 末端部分の 14 番目までのアミノ酸配列を Fig. 7 に示す。相当する HEWL の配列と比較すると、4 残基目の Gly, 9 残基目の Ala が一致したが、他には全く相同性がみられなかった。また、この配列は HEWL の全アミノ酸配列中に見い出されなかった。リゾチームの一次構造は広範の生物について明らかにされている。これらの N 末端アミノ酸はほとんどが Lys であり、コウライキジ卵白の Gly,²²⁾ ツメバケイ胃の Glu²³⁾ およびオボッサムミルクの Ser²⁴⁾ のみが例外として認められているにすぎない。この点から Tyr を N 末端アミノ酸とするヤマトシジミ・リゾチームも特異なりゾチームといえる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、実験費の一部を日本大学学術助成金奨励研究 (A98-051) によった。

文 献

- 1) A. Fleming: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and sections. *Proc. Roy. Soc. (London)*, **93**, 306-317 (1922).
- 2) P. Jolles: Lysozymes: A chapter of molecular biology. *Angew. Chem.*, **8**, 227-239 (1969).
- 3) R. Rodrigues, L. Menendez-Arias, G. G. Buitrago, and G. Gavilanes: Amino acid sequence of pigeon egg-white lysozyme. *Biochem. Int.*, **11**, 841-843 (1985).
- 4) T. Araki, K. Kudo, M. Kuramoto, and T. Torikata: The amino acid sequence of Indian peafowl *Pavo cristatus* lysozyme and its comparison with lysozymes from phasianoid birds. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2955-2962 (1989).
- 5) R. Fåge, G. Lundblad, and J. Lind: Lysozyme and chitinase in blood and lymphoid tissues of marine fish. *Mar. Biol.*, **36**, 277-282 (1976).
- 6) 望月 篤, 松宮政弘: 海産魚のリゾチーム分布. 日本誌, **47**, 1065-1068 (1981).
- 7) 伊丹利明, 竹原 淳, 長野義将, 末綱邦男, 満谷 淳, 武居 薫, 高橋幸則: アユ体表粘液由来のリゾチームの精製. 日本誌, **58**, 1937-1944 (1992).
- 8) J. Jolles and P. Jolles: Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.*, **173**, 269-273 (1988).
- 9) A. Dautigny, D. Pham-Dinh, J. Jolles, P. Jolles, E. M. Prager, and F. Pakdel: cDNA and amino acid sequences of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *J. Mol. Evol.*, **32**, 187-198 (1991).
- 10) J. G. McHenery and T. H. Birkbeck: Lysozyme of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Mar. Biol. Lett.*, **1**, 111-119 (1979).
- 11) J. G. McHenery and T. H. Birkbeck: Characterization of the lysozyme of *Mytilus edulis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **70B**, 583-589 (1982).
- 12) 高野計介, 森 勝義, 野村 正: 海産二枚貝におけるリゾチームの存在と特性. 日本誌, **52**, 863-868 (1986).
- 13) 望月 篤, 松宮政弘: 貝類のリゾチーム分布. 日本誌, **49**, 131-135 (1983).
- 14) B. Myrnes and A. Johansen: Recovery of lysozyme from scallop waste. *Prepar. Biochem.*, **24**, 69-80 (1994).
- 15) 望月 篤, 松宮政弘: サザエリゾチームの性質, 日大農獣報, **51**, 169-173 (1994).
- 16) K. Miura, M. Matsumiya, and A. Mochizuki: Seasonal variation in lysozyme activity in the mussel *Mytilus edulis*. *Fisheries Sci.*, **60**, 441-443 (1994).
- 17) T. Imoto and K. Yagishita: A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154-1156 (1971).
- 18) A. Ohtakara: Chitinase and β -N-acetylhexosaminidase from *Pycnoporus cinnabarinus*, in "Methods in Enzymology" (ed. by W. A. Wood and S. T. Kellogg), Vol. 161B, Academic Press, California, 1988, pp. 462-470.
- 19) R. A. Reisfeld, U. J. Lewis, and D. E. Williams: Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, **195**, 281-283 (1962).
- 20) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 21) 滝尾祐士: タンパク質の切断, 「新生化学実験講座 1, タンパク質 II 一次構造」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1990, pp. 75-76.
- 22) L. S. Weisman, B. M. Krummel, and A. C. Wilson: Evolutionary shift in the site of cleavage of prelysozyme. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2309-2313 (1986).
- 23) J. R. Kornaray, J. W. Schilling, and A. C. Wilson: Molecular adaptation of a leaf-eating bird; stomach lysozyme of the hoatzin. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 921-928 (1994).
- 24) K. Nicholas, M. Loughnan, M. Messer, G. Munks, M. Griffiths, and D. Shaw: Isolation, partial sequence and asynchronous appearance during lactation of lysozyme and α -lactalbumin in the milk of a marsupial, the common ringtail possum. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**, 775-778 (1989).