蛇毒の酵素化学的研究 (第 9 報¹⁾) タイワンハブ毒よりアルギニンエステル
水解酵素 (ME-2) の精製およびその性質²⁾

杉原久義,* 二改俊章, 二村敦子, 田中哲之助
名城大学薬学部³⁾

Enzymochemical Studies on Snake Venoms. IX.¹⁾ Purification and
Properties of Arginine Ester Hydrolase (ME-2) in the Venom
of *Trimeresurus mucrosquamatus*²⁾

HISAYOSHI SUGIHARA,* TOSHIKI NIKAI, ATSUKO NIMURA, and TETSUNOSUKE TANAKA
Faculty of Pharmacy, Meijo University,³⁾ Yagotourayama, Tenpaku-ku, Nagoya

(Received August 13, 1980)

An arginine ester hydrolase, ME-2 was isolated from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* by gel filtration on Sephadex G-100 and ion exchange chromatographies on CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephacel. By these procedures, 6.7 mg of purified preparation was obtained from 1g of crude venom. This enzyme hydrolyzed arginine esters, such as N-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) or N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), but did not hydrolyze casein, hemoglobin, N-tosyl-L-lysine methyl ester (TLME), N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), N-tosyl-L-argininamide (TAA) or N-benzoyl-L-argininamide (BAA). The esterolytic activity was inhibited by benzamidine but not by diisopropyl fluorophosphate (DFP) or trasyolol. The purified preparation was homogeneous as judged by disc electrophoresis on polyacrylamide gel and isoelectric focusing.

The molecular weight of ME-2 was determined to be approximately 29800, and the isoelectric point was found to be pH 5.62 by isoelectric focusing with carrier ampholyte. The esterolytic activity of the final preparation was 779.8 units/mg. This enzyme had capillary permeability-increasing and kinin-releasing activities. This protein was stable to heat treatment, and between pH 5 and 9. Its Michaelis constant (K_m) for TAME and inhibition constant (K_i) for benzamidine were found to be 4.27×10^{-3} M and 0.194×10^{-3} M, respectively. This protein contained a small amount of carbohydrates.

Keywords—Venom; purification of arginine ester hydrolase ME-2; *Trimeresurus mucrosquamatus*; gel, ion exchange chromatography; capillary permeability-increasing, kinin-releasing activity; homogeneity determination by electrophoresis

台湾に生息する毒蛇であるタイワンハブ (*Trimeresurus mucrosquamatus*) から著者らは、先にアルギニンエステル水解酵素の 1 つ ME-1 を単離し、その生化学的性質などを報告した。¹⁾ 蛇毒中に含まれるアルギニンエステル水解酵素はキニン遊離作用、毛細血管透過性亢進作用あるいは血液凝固作用などを示すことが知られており、毒蛇咬症時における傷害作用に重要な役割を果たしていることが推定されている。

タイワンハブ毒は蛇毒中では最も強いアルギニンエステル水解活性を有しており、ME-1 以外にもこの酵素が含まれている。今回新たに他の 1 つを分離し、その生化学的性質、生理学的性質を調べ、咬症時における役割を解明することを試みた。

実 験 の 部

材料 新鮮凍結乾燥タイワンハブ毒は台湾の蘇卿杼氏より入手した素性のあきらかなものを用いた。Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephacel はファルマシア社製、N-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), N-benzoyl-L-argininamide (BAA), N-tosyl-L-argininamide (TAA), N-tosyl-L-lysine methyl ester (TLME), N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), bradykinin は大阪大学蛋白質研究所奨励会事業部, soy bean trypsin inhibitor (SBTI), lima

bean trypsin inhibitor (LBTI), egg white trypsin inhibitor (EWTI), *N*-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), *N*-*p*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), benzamidine, *p*-chloromercuribenzoate (PCMB), diisopropyl fluorophosphate (DFP), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) はシグマ社製, trasyol はバイエル株式会社より購入した. その他の試薬は試薬特級を使用した.

各種活性の測定法 アルギニンエステル水解活性——Roberts⁴⁾ の方法に準拠した. 基質として TAME を用いた. 適当濃度の試料 0.1 ml, 0.4 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 0.8 ml, 0.1 M 基質液 0.1 ml を混和し, 37°, 15 分間反応後, 2 M 塩酸ヒドロキシルアミンと 3.5 M 水酸化ナトリウムの等量混液 1 ml を加え反応を止め, 20 分後 6% TCA (4 N HCl) 0.5 ml, 0.1 M FeCl₃ (0.04 N HCl) 2 ml で発色し, 500 nm の吸光度を測定した. 活性の単位は 1 分間に 1 μmol の基質を水解する活性を 1 単位とした.

キニン遊離活性——Erspamer^{5,6)} らの方法に準拠した. 前日エストラジオールを腹腔内に注射しておいた処女ラットより子宮を摘出し, De Jalon 液中に 28—30° においてその収縮を測定した. 基質としては牛血しょうを 60°, 30 分処理後, 終濃度 10⁻³ M になるように *o*-phenanthroline を加えたものを用いた. その 0.1 ml, 適当濃度の試料液 0.1 ml を 37°, 3 分間反応後, 100° に加熱して反応を止めその 0.1 ml を用いて前記ラット子宮の収縮を測定した. 活性の単位は, あらかじめ合成 bradykinin を用いて作製しておいた標準曲線より力価 (ng) を求めた.

毛細血管透過性亢進作用——Miles⁷⁾ の方法に準拠した. 2—2.5 kg の家兎を硫化バリウム脱毛剤で脱毛後, チンク油をぬり 24 時間後エバンスブルーの 20 mg を 2 ml の生理食塩水に溶かしたものを静脈内に注射後, 試料液 0.1 ml を皮内に注射した. 1 時間後, エーテルにより殺し, 皮膚をはぎとりガラス板に固定し, 裏側からその青色斑の直径を測定した. 10 mm を越える青色斑が認められたものを毛細血管透過性亢進作用を有するものと判定した.

血液凝固活性⁸⁾——基質として 0.1% bovine fibrinogen 生理食塩水溶液 1.8 ml を内径 10 mm, 長さ 10 cm の小試験管に入れ, あらかじめ 28±1° で保温しておく. これに蛇毒液 0.2 ml を吹出しピペットで加えた. 活性の単位はクロット出現までの秒数の逆数をタンパク量で割りそれを 10 倍して表わした. その他の活性は第 1 報⁹⁾ で報告した通りである.

結 果

アルギニンエステル水解酵素 ME-2 の分離

Sephadex G-100 ゲルろ過および CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィー 今回分離を試みた ME-2 は Sephadex G-100, CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーの段階では前報¹⁾ の ME-1 と同一画分に溶出してくるので, 前報¹⁾ と同一条件で溶出を行った. すなわち Sephadex G-100 では P 4 画分をとり, 次の CM-Sephadex C-50 にアプライした. この段階でアルギニンエステル水解活性は試験管番号 130—151 と 211—234 の 2 つに分かれて溶出してくるが, ME-1 と ME-2 は分離されず前の画分に存在する.

DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィー CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーの第 1 画分 (試験管番号 130—151) を 0.01 M NaCl 含有 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で透析し, DEAE-Sephadex A-50 にアプライした. NaCl 濃度を 0.5 M まで直線的に上昇させたところ Fig. 1 のようなパターンが得られた. エステラーゼ活性はここでまた 2 つに分れて溶出される. 最初のピークを ME-1, 後のピークを ME-2 とし, ME-1 は前報¹⁾ で報告した通り精製単離された. 今回は ME-2 についてさらに精製を進めた. ME-2 画分を集め, 0.01 M NaCl 含有 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で透析を行った.

DEAE-Sephacel クロマトグラフィー 透析した画分を DEAE-Sephacel にアプライし素通り画分を分取した後, NaCl 濃度を 0.5 M まで直線的に上昇させたところ Fig. 2 に示すようなパターンが得られた. この画分 (試験管番号 162—169) の精製の度合を調べるためにディスク電気泳動を行った.

最終標品の均一性

ディスク電気泳動¹⁰⁾ Fig. 3 はポリアクリルアミドを支持体とした pH 8.3 ゲル標準ディスク電気泳動で試料は約 7 μg を用いた. このように完全に単一となっていることがわかる. これを最終標品として以下の実験を行った.

分子量の測定

Shapiro ら¹¹⁾ および Weber と Osborne¹²⁾ の方法による SDS ディスク電気泳動法により測定を行った. 10%

Fig. 1. DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatography

The TAME hydrolase fraction obtained from CM-Sephadex C-50 column chromatography was applied to a column (1.9×43 cm) of DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.5. The column was eluted with a linear gradient from 0.01 M—0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/hr.

●—●: absorbance at 280 nm,
 ---: conductivity,
: TAME hydrolytic activity

Fig. 2. DEAE-Sephacel Column Chromatography

The TAME hydrolase fraction (indicated with black bar in Fig. 1) was applied to a column (1.9×43 cm) of DEAE-Sephacel equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer containing 0.01 M NaCl, pH 7.5. The column was eluted with linear gradient from 0.01 M—0.5 M NaCl in 300 ml of the buffer. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/hr.

●—●: absorbance at 280 nm,
 ---: conductivity,
: TAME hydrolytic activity.

Fig. 3. Disc Electrophoresis of ME-2

Fig. 4. Molecular Weight Determination of ME-2 by SDS-disc Electrophoresis

1: bovine serum albumin, 2: ovalbumin, 3: carbonic anhydrase, 4: ME-2, 5: soy bean trypsin inhibitor.

ポリアクリルアミドゲルを支持体とし、0.1% Bromphenol blue 液をマーカーとして 3% メルカプトエタノール存在下で 1 本あたり 7 mA, 約 3 時間泳動した。標準としてトリプシンインヒビター、カーボニックアンヒドラーゼ、オプアルブミン、牛血清アルブミンを用いて各々の易動度の差から分子量を求めたところ Fig. 4 に示すように分子量 29800 と算出された。なおこの操作においても最終標品は単一のバンドとして認められた。

等電点¹³⁾

最終標品を 1% グリシン溶液で透析後、LKB 8100 エレクトロフォーシング蛋白分離装置を用いて、pH 5—8 のキャリアーアンボライトで、700 V で 48 時間泳動後、280 nm および pH を測定し等電点を求めた結果、pH 5.62 と測定された。Fig. 5 のように単一のピークとして示され単一性がうかがわれた。

Fig. 5. Isoelectric Focusing of Purified ME-2

Isoelectric focusing with carrier ampholyte covering the pH 5—8 was conducted in a column of capacity 110 ml for 48 hr at 4°.

●—●: absorbance at 280 nm,
 ---: pH,
: TAME hydrolytic activity.

Fig. 6. Patterns of Capillary Permeability-Increasing Activity observed from the Inside of the Skin

Dilutions of ME-2 were injected intracutaneously into a rabbit and the reactions were observed after 1 hr.

キニン遊離活性

ラット子宮を用いて活性を測定した結果、ME-2 は 12.7 $\mu\text{g}/\text{mg}/3 \text{ min}$ のキニン遊離活性を示した。

毛細血管透過性亢進活性

Fig. 6 に示すように ME-2 の 3 μg , 1 μg , 0.3 μg , 0.1 μg を家兎皮内に接種すると接種部位の毛細血管よりエバンスブルーが透過し、著明な青色斑を形成することが観察され、0.1 μg の部位でも直径 10 mm の青色斑が認められた。

血液凝固活性

ME-2 (17 μg) を用いて凝固活性を測定した結果、clot の出現は認められず血液凝固活性は陰性であった。

粗毒と最終標品の各種生理活性および酵素活性の検討

Table I は粗毒と最終標品における各種生理活性および酵素活性を測定したものである。最終標品中にアルギニンエステル水解活性および毛細血管透過性亢進活性およびキニン遊離活性が存在し粗毒中の他の活性は認められなかった。

Table II は各精製段階におけるエステラーゼ活性の動向を示したものである。粗毒の 50.6 units/mg から 779.8 units/mg と 15.4 倍に活性が上昇しその収量は 10.4% であった。

基質特異性

各種基質に対する ME-2 の水解活性を検討した結果、TAME (779.8 units/mg),

TABLE I. Various Enzymatic and Physiological Activities of Crude Venom and ME-2

Enzymatic activities	Crude venom	ME-2
Proteinase	+	—
TAME hydrolase	+	+
Phosphomonoesterase	+	—
Phosphodiesterase	+	—
5'-Nucleotidase	+	—
ATPase	+	—
Phospholipase A	+	—
Physiological activities		
Hemorrhagic	+	—
Lethal	+	—
Kinin-releasing	+	+
Capillary permeability-increasing	+	+

TABLE II. Summary of the Purification of ME-2

Step	Protein (mg)	TAME hydrolase activity			
		Units/mg	Total activity	Relative activity	Yield (%)
Crude venom	1000	50.6	50550	1.0	100
Sephadex G-100	546	81.4	44433	1.6	87.9
CM-Sephadex	79.1	409.7	32418	8.1	64.1
DEAE-Sephadex	12.9	561.7	7258	11.1	14.4
DEAE-Sephacel	6.7	779.8	5256	15.4	10.4

Fig. 7. Heat Stability of ME-2

ME-2 was heated for 15 minutes at varying temperatures and then quickly chilled in ice water. TAME hydrolase activity was determined as described in the text.

Fig. 8. pH Stability of ME-2

ME-2 was incubated for 1 hr at varying pH values. At the end of the incubation, the solution was immediately readjusted to pH 8.5 and then assayed for TAME hydrolase activity as described in the text. The buffer used was Britton-Robinson buffer for pH 2–13.

BAEE (228.1 units/mg) のような低分子合成アルギニンエステルを水解した。しかし天然高分子基質であるカゼイン、熱変性ヘモグロビンやリジンエステル (TLME)、チロシンエステル (ATEE)、アルギニンアミド (BAA, TAA) は水解せず ME-1 とよく類似した高い基質特異性を有することが認められた。

熱安定性

Fig. 7 は最終標品を 0.4 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中で 37°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90° の各温度で 15 分間保温後、アルギニンエステル水解活性を測定し、37° での活性と比較してその度合を % で示したものである。50° で 80%, 70° では約 50% の残存活性を示すことから判るとおり、本酵素は ME-1 や他の蛇毒アルギニンエステラーゼと同様、耐熱性であることが認められた。

pH 安定性

Fig. 8 は最終標品を Britton-Robinson 緩衝液¹⁴⁾ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 に加え 37°, 1 時間保温後、アルギニンエステル水解活性を測定し、pH 7.0 での活性と比較してその度合を % で示したものである。酸性側で安定であり、アルカリ側ではそれにくらべやや不安定であるが、幅広い pH で活性を示すことが認められた。この点も ME-1 との類似性が示された。

Fig. 9. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-2

○—○: absence of benzamidine,
●—●: presence of benzamidine.

けるセリン酵素とされているので、さらに PMSF (10 mM) を用いてこの点を確認したが、DFP の場合と同様阻害を受けなかった。

K_m および K_i の測定

Fig. 9 は Lineweaver-Burk¹⁷⁾ のプロット図を作製し図から K_m , K_i を求めた結果である。 K_m は基質として、TAME ($1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$, $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $7.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $10 \times 10^{-3} \text{ M}$, $20 \times 10^{-3} \text{ M}$) を用いた。その結果、 K_m は $4.27 \times 10^{-3} \text{ M}$ と測定された。 K_i は終濃度 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ 塩酸ベンズアミジンをを用い最終標品と 37° , 15 分間保温したものを酵素液とし、基質として TAME を用いて測定した。その結果、本酵素の K_i は $0.194 \times 10^{-3} \text{ M}$ と測定された。

総 括

1. 新鮮タイワンハブ毒から Sephadex G-100, CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephacel の精製操作を経てアルギニンエステル水解酵素 ME-2 を得た。
2. この精製酵素について均一性を調べた結果、ディスク電気泳動, SDS ディスク電気泳動, 等電点分画でそれぞれ単一であった。
3. TAME を基質として測定した本酵素のエステラーゼ活性は 779.8 units/mg で粗毒の活性の 15.4 倍を示した。
4. 本酵素は塩酸ベンズアミジンにより阻害されるが、DFP, trasyrolol, EDTA, 各種トリプシンインヒビター, TLCK, TPCK, PCMB, システインでは阻害されなかった。
5. TAME を基質とした本酵素の K_m は $4.27 \times 10^{-3} \text{ M}$, 塩酸ベンズアミジンを用いて測定した K_i は $0.194 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。
6. 熱に対して安定であり、また幅広い pH 域で安定であった。
7. 本酵素は高い基質特異性を持ち、生理活性としては毛細血管透過性亢進作用およびキニン遊離活性を示した。

考 察

アルギニンエステル水解酵素はマムシ科, クサリヘビ科の蛇毒中に存在することが報告されている。¹⁸⁾ これら

糖の定性および定量試験

最終標品についてアンスロン硫酸反応,¹⁵⁾ フェノール硫酸反応¹⁶⁾ およびディスク電気泳動後に PAS 染色を行ったところ陽性であった。アンスロン硫酸法により、グルコースの検量線から求めた ME-2 の糖含量はグルコースに換算して $2.0 \mu\text{g}/\text{mg}$ であった。

各種阻害剤による影響

最終標品 $0.66 \mu\text{g}$ と各種阻害剤をカッコ内に示した最終濃度になるように混合し、 37° , 15 分間保温後 TAME 水解活性を測定した結果、塩酸ベンズアミジン (10 mM) によってのみ活性が阻害された。しかし DFP (10 mM) をはじめ trasyrolol (10 mM), SBTI (0.2%), LBTI (0.2%), EWTI (0.2%), heparin (0.2%), cysteine (10 mM), EDTA (10 mM), TLCK (10 mM), TPCK (10 mM), PCMB (10 mM) によっては何ら影響を受けなかった。現在までに報告されている蛇毒のアルギニンエステル水解酵素はすべて DFP で阻害を受

TABLE III. Comparisons of Various Properties of ME-1 between ME-2

Property	ME-1	ME-2
Molecular weight	27000	29800
Isoelectric point	pH 5.95	pH 5.62
Heat stability	Stable	Stable
pH stability	Wide range	Wide range
Hexoses	3.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Inhibition by DFP	—	—
Inhibition by benzamidine	+	+
Substrate specificity	High	High
K_m (TAME)	$4.0 \times 10^{-3}\text{M}$	$4.27 \times 10^{-3}\text{M}$
K_i (Benzamidine)	$0.292 \times 10^{-3}\text{M}$	$0.194 \times 10^{-3}\text{M}$
Capillary permeability-increasing activity	+	+
Kinin-releasing activity	—	+
Clotting activity	—	—

の酵素はすべて DFP で失活する活性セリン残基を有するエステラーゼで,¹⁹⁾ 分子量 30000 前後の耐熱性酵素であることが知られている。その生理活性はキニン遊離作用, 毛細血管透過性亢進作用および血液凝固作用が報告されている。²⁰⁾

著者らは前報¹⁾ でタイワンハブ毒より毛細血管透過性亢進作用を有するアルギニンエステル水解酵素 ME-1 を精製し報告した。ME-1 は分子量 27000, 耐熱性であることなどは既報の蛇毒アルギニンエステラーゼと類似しているが DFP で阻害を受けない点が大きな相違点であった。今回報告した ME-2 は等電点分画で単一のピークを示し, また pH 8.3 ゲル標準ディスク電気泳動, SDS ディスク電気泳動で単一のバンドを示すことより単一の標品と認めることができる。その性質は Table III に示すように ME-1 と極めてよく類似している。分子量, 等電点, 基質特異性, 耐熱性, pH 安定性, 微量の糖を含有すること, DFP で阻害を受けないこと, 塩酸ベンズアミジンで阻害されること, K_m , K_i などの諸点や毛細血管透過性亢進作用を有する点など多項目にわたって類似点をもっていた。しかし ME-2 には生理活性としてさらにキニン遊離作用があり, この点が ME-1 と大きく異なっていた。血中のキニノーゲンを限定分解してキニンを遊離することのできる蛇毒アルギニンエステラーゼとしてはマムシ毒,^{20,21)} *Bitis gabonica* 毒,²²⁾ *Vipera ammodytes ammodytes* 毒²³⁾ などから得られたものが報告されている。この中 *B. gabonica* 毒からは 2 種類のアルギニンエステラーゼがキニンを遊離するが, 両者とも毛細血管透過性については調べられていない。一方, マムシ毒から得られたキニン遊離酵素は毛細血管透過性亢進作用をもっていない。マムシ毒中のこの作用を示す酵素は別のアルギニンエステラーゼであることが報告されている。²⁰⁾ キニンの薬理作用として毛細血管透過性亢進作用があるが, マムシ毒からのエステラーゼはキニンを遊離しても家兎皮内では透過性亢進作用を示さない。今回我々が単離した ME-2 はキニンを遊離する作用と毛細血管透過性を亢進する作用を有している。

タイワンハブ毒から得られたアルギニンエステラーゼ ME-1, ME-2 は他の蛇毒のものと異なり, DFP で阻害されなかった。今まで報告されている蛇毒アルギニンエステラーゼはすべてセリン酵素で, DFP で阻害を受けることが知られている。この点をさらに確かめるため PMSF による阻害の有無を調べたが, 両者とも阻害を受けず, 従来から報告されている酵素とは違ったタイプの酵素であることが判明した。この毒中にはこれら 2 種以外にもアルギニンエステラーゼが存在するので, それらを単離してその諸性質を調べたいと考えている。

引用文献および注

- 1) 第 8 報: 杉原久義, 二改俊章, 二村敦子, 田中哲之助, 薬誌, **100**, 1035 (1980).
- 2) 日本薬学会第 99 年会, 札幌, 1979 年 8 月.
- 3) Location: *Yagotourayama, Tenpaku-ku, Nagoya*.
- 4) P.S. Roberts, *J. Biol. Chem.*, **232**, 285 (1958).

- 5) V. Erspamer, F. Erspamer, *Brit. J. Pharmacol.*, **19**, 337 (1962).
- 6) I. Trautsohold, "Handbook of Experimental Pharmacology," XXV, Berlin, Springer Verlag, 1970, p. 53.
- 7) A.A. Miles, D.L. Wilhelm, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **36**, 71 (1955).
- 8) 第八改正日本薬局方第一部解説書, 日本公定書協会編, 広川書店, 東京, 1971, p. 1224.
- 9) 杉原久義, 二改俊章, 森浦正憲, 神谷和人, 田中哲之助, 日細菌, **27**, 47 (1972).
- 10) 永井 裕, 別冊蛋核酵, 物理化学の実験法, **3**, 3 (1967).
- 11) A.L. Shapiro, E. Vinuela, J.V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815 (1967).
- 12) K. Weber, M. Osborne, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- 13) 松尾雄志, 堀尾武一, 蛋核酵, **12**, 737, (1967).
- 14) H. T. S. Britton, R. A. Robinson, *J. Chem. Soc.*, Part 1, **1931**, 1456.
- 15) D.L. Morris, *Science*, **107**, 254 (1948).
- 16) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Nature*, **168**, 107 (1951); *idem*, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 17) H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
- 18) A.T. Tu, G.P. James, A. Chua, *Toxicon*, **3**, 5 (1965); *idem*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **8**, 218 (1966).
- 19) T. Omori, S. Iwanaga, T. Suzuki, *Toxicon*, **2**, 1 (1964).
- 20) T. Sato, S. Iwanaga, Y. Mizushima, T. Suzuki, *J. Biochem.*, **57**, 380 (1965).
- 21) S. Iwanaga, T. Sato, Y. Mizushima, T. Suzuki, *J. Biochem.*, **58**, 123 (1965).
- 22) C.C. Viljoen, C.M. Meehan, D.P. Botes, *Toxicon*, **17**, 145 (1979).
- 23) G.S. Bailey, R.A. Shipolini, *Biochem. J.*, **153**, 409 (1976).