薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (6) 560-567 (1982)

蛇毒の酵素化学的研究 (第 10 報¹⁾) タイワンハブ毒よりアルギニンエステ
テル水解酵素 (ME-3) の精製およびその性質²⁾

杉原久義,* 二村敦子, 加藤智子, 二改俊章
名城大学薬学部

Enzymochemical Studies on Snake Venoms. X.¹⁾ Purification and
Properties of Arginine Ester Hydrolase (ME-3) in the
Venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*²⁾

HISAYOSHI SUGIHARA,* ATSUKO NIMURA, TOMOKO KATO and TOSHIAKI NIKAI

Faculty of Pharmacy, Meijo University,
Yagotourayama, Tenpaku-ku, Nagoya

(Received December 24, 1981)

One of the TAME hydrolases of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom was isolated by a combination of gel filtration on Sephadex G-100 and ion exchange chromatographies on CM-Sephadex C-50, Aminoethyl-Sepharose 4B and DEAE-Sephacel. From 1 g of the lyophilized venom 1.5 mg of purified arginine ester hydrolase was obtained. The substrate specificity of this enzyme was strictly directed to the hydrolysis of ester linkages to which an arginine residue contributed the carbonyl group. The esterolytic activity was inhibited by benzamidine, *N*-(*p*-tosyl)-*L*-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) or diisopropyl fluorophosphate (DFP).

The purified enzyme was proved to be homogeneous by electrophoresis on polyacrylamide gel and isoelectric focusing. The molecular weight was found to be about 33000. Its isoelectric point was 6.93. The esterolytic activity of the final preparation was 125.7 unit/mg. This enzyme had capillary permeability-increasing activity, but not kinin-releasing and clotting activities. This protein was stable to heat treatment, and between pH 4—9. Its Michaelis constant (K_m) for TAME and inhibition constants (K_i) for benzamidine, TPCK, and DFP were found to be 7.81×10^{-3} M, 0.67×10^{-3} M, 0.43×10^{-3} M, and 3.66×10^{-3} M, respectively. This enzyme was a glycoprotein.

Keywords—venom; purification of TAME hydrolase ME-3; *Trimeresurus mucrosquamatus*; gel, ion exchange chromatography; capillary permeability-increasing; homogeneity determination by electrophoresis

タイワンハブ咬傷時に認められる傷害としては致死の他に咬傷局所の強い出血と壊死がある。著者らはこの病変がタイワンハブ毒中のいかなる因子によって惹き起こされるのかを解明し、あわせてその対策を検討する目的で、各種活性因子の単離とその生化学的性質、生理学的性質を調べている。

蛇毒アルギニンエステル水解酵素は極めて興味深い生理活性を示すことが知られている。著者らはすでにこの毒から ME-1,³⁾ ME-2¹⁾ の 2 種類のアルギニンエステル水解酵素を単離し、報告している。現在知られている蛇毒中では最も強いこの酵素活性を持っているタイワンハブ毒には前 2 者の他にもアルギニンエステル水解酵素が含まれている。今回新たにその 1 つを単離しその生化学的性質、生理活性を調べたのでここに報告する。

実験の部

材料

新鮮自然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, CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephacel, Sepharose 4B はファルマシア社製、*N*-tosyl-*L*-arginine methyl ester (TAME), *N*-benzoyl-*L*-arginine ethyl ester (BAEE), *N*-tosyl-*L*-argininamide (TAA), *N*-benzoyl-*L*-argininamide (BAA), *N*-tosyl-*L*-lysine methyl ester (TLME), *N*-acetyl-*L*-tyrosine ethyl ester (ATEE), bradykinin は株式会社ペプチド研究所, soy bean trypsin inhibitor (SBTI), limabeane

trypsin inhibitor (LBTI), egg white trypsin inhibitor (EWTI), *N*-(*p*-tosyl)-*L*-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), benzamidine, *p*-chloromercuribenzoate (PCMB), diisopropyl fluorophosphate (DFP) はシグマ社製, trasyolol 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°C, 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, 0.11 M FeCl₃ (0.04 M 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°C においてその収縮を測定した. 基質としてはウシ血しょうを 60°C, 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°C, 3 分間反応後, 100°C 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°C 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-3 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-3 は Sephadex G-100, CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーの段階までは第 8 報³⁾ (杉原ら, 薬誌第 8 報 Fig. 1,

Fig. 1. Aminoethyl-Sepharose 4B Column Chromatography

The TAME hydrolase fraction obtained from CM-Sephadex C-50 column chromatography was applied to a column (1.9 cm × 43 cm) of Aminoethyl-Sepharose 4B equilibrated with 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. The column was eluted with a linear gradient consisting of 400 ml each of 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2 and 500 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/h.

●—●: 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 cm × 43 cm) of DEAE-Sephacel equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer containing 10 mM NaCl, pH 7.2. The column was eluted with a linear gradient from 10–300 mM NaCl in 300 ml of the buffer. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/h.

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

2 参照) 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 (P 1) と 211—234 (P 6) の 2 つに分かれて溶出してくるが, P 1 からはすでに報告したとおり ME-1,³⁾ ME-2¹⁾ が単離されている. 今回は P 6 画分を集め 5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) で透析を行った.

Aminoethyl-Sepharose 4 B クロマトグラフィー 透析した画分を Aminoethyl-Sepharose 4 B にアプライし素通り画分を分取した後, トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) を 500 mM まで直線的に上昇させたところ, Fig. 1 に示すようなパターンが得られた. アルギニンエステル水解活性を示す試験管番号 118—180 を集め 10 mM NaCl 含有 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) で透析を行った.

DEAE-Sephacel クロマトグラフィー (1st) 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 300 mM 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. ア

Fig. 3. DEAE-Sephacel Column Chromatography (2nd)

The TAME hydrolase fraction (indicated with black bar in Fig. 2) was applied to a column (1.9 cm × 43 cm) of DEAE-Sephacel equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer containing 10 mM NaCl, pH 7.2. The column was eluted with a linear gradient from 10—150 mM NaCl in 300 ml of the buffer. 3-ml fractions were collected. the flow rate was 27 ml/h.

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

Fig. 4. DEAE-Sephacel Column Chromatography (3rd)

The TAME hydrolase fraction (indicated with black bar in Fig. 3) was applied to a column (1.9 cm × 43 cm) of DEAE-Sephacel equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer containing 10 mM NaCl, pH 7.2. The column was eluted with a linear gradient from 10—100 mM NaCl in 300 ml of the buffer. 3-ml fractions were collected. The flow rate was 27 ml/h.

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

Fig. 5. Disc Electrophoresis of ME-3

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

Dilutions of ME-3 were injected intracutaneously into a rabbit and the reaction was observed after 1 h.

ルギニンエステル水解活性は 3 つに分かれて溶出してくるが今回は第 1 画分（試験管番号 166—183）を精製するために 10 mM NaCl 含有 10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.2）で透析を行った。

DEAE-Sephacel クロマトグラフィー（2 nd） 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 150 mM まで直線的に上昇させたところ Fig. 3 に示すようなパターンが得られた。試験管番号 131—144 を集め 10 mM NaCl 含有 10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.2）で透析を行った。

DEAE-Sephacel クロマトグラフィー（3 rd） 透析した画分を DEAE-Sephacel にアプライし NaCl 濃度を 100 mM まで直線的に上昇させたところ Fig. 4 に示すようなパターンが得られた。この画分（試験管番号 131—146）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. 5 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 5 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 ME-3 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 %ポリアクリルアミドゲルを支持体とし 3% メルカプトエタノール存在下で 1 本当たり 7 mA、約 3 時間泳動した。標準として BDH 社製分子量測定マーカー（monomer 14300, dimer 28600, trimer 42900, tetramer 57200, pentamer 71500）を用いて各々の易動度の差から分子量を求めたところ分子量 33000 と算出された。なおこの操作においても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 エレクトロフォーミング蛋白分離装置を用いて、pH 5—8 のキャリアアンホライトで、4°C、700 V、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、単一ピークを示し、等電点は 6.93 と測定された。

毛細血管透過性亢進活性

Fig. 6 に示すように ME-3 の 3 μg, 5 μg を家兔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た。

キニン遊離活性

ラット子宮を用いて活性を測定したが、ME-3 (5 μg) はキニン遊離活性を示さなかった。

血液凝固活性

ME-3 (10 μg) を用いて凝固活性を測定したが、clot の出現は認められず、陰性であった。

出血活性

ME-3 (50 μg) を家兔皮内およびマウス皮内に接種し、24 時間後にエーテル麻酔により殺し皮をはいで、皮膚の裏側より出血斑の有無を観察したが、出血斑は認められなかった。

TABLE I. Various Enzymatic and Physiological Activities of Crude Venom and ME-3

	Crude venom	ME-3
Enzymatic activities		
TAME hydrolase	+	+
Proteinase	+	—
Phosphomonoesterase	+	—
Phosphodiesterase	+	—
5'-Nucleotidase	+	—
ATPase	+	—
Phospholipase A	+	—
Physiological activities		
Hemorrhage	+	—
Lethal	+	—
Kinin-releasing	+	—
Capillary permeability Increasing	+	+

TABLE II. Summary of the Purification of ME-3

Step	Protein (mg)	TAME hydrolase activity			Yield (%)
		Specific activity (units/mg)	Total activity (units)	Relative activity	
Crude venom	1000	51.7	51738	1.0	100
Sephadex G-100	459.7	66.1	30397	1.3	58.8
CM-Sephadex	84.5	77.7	6564	1.5	12.7
Aminohexyl-Sepharose 4B	18.3	105.5	1925	2.0	3.7
DEAE-Sephacel (1st)	5.1	115.8	589	2.2	1.1
DEAE-Sephacel (2nd)	2.1	122.5	256	2.4	0.5
DEAE-Sephacel (3rd)	1.5	125.7	185	2.4	0.4

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。最終標品中には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。ME-3 のエステラーゼ活性は 125.7 units/mg で、粗毒の 51.7 units/mg にくらべ 2.4 倍と上昇している。しかしタイワンハブ毒中に含まれるこの酵素活性を示す因子は 4—5 種類あり、単一の因子が精製されて 2.4 倍の活性を示しているものではない。収量 0.4% が示す通り、タイワンハブ毒中の ME-3 は極めて少い。

基質特異性

各種基質に対する ME-3 の水解活性を検討した結果、TAME (125.7 units/mg), BAEE (71.3 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, ME-2 と同様高い基質特異性を有することが認められた。

熱安定性

最終標品を 0.4 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) 中で 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 95°C の各温度で 20 分間保温後、アルギニンエステル水解活性を測定し、37°C での活性と比較した。70°C で 55%, 80°C で 38%, 90°C で 25% の残存活性を示したことより本酵素も ME-1, ME-2 と同様、耐熱性であることが認められた。

pH 安定性

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°C, 24 時間保温後, 常法に従い pH 8.5 でアルギニンエステル水解活性を測定し, pH 7.0 での活性と比較した. pH 4 で 85%, pH 5—8 では 97% 以上, pH 12 では約 30% の残存活性を示したことより, 幅広い pH で安定であった. この点でも ME-1, ME-2 との類似性が示された.

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法により, グルコースの検量線から求めた ME-3 の糖含量はグルコースに換算して 63.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ であった.

各種阻害剤による影響

最終標品 6 μg 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°C, 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 87%, DFP (10 mM), TPCK (10 mM) によっては 100% 阻害され, trasyolol (10 mM), SBTI (0.2%), LBTI (0.2%), EWTI (0.2%), heparin (0.2%), cysteine (10 mM), EDTA (10 mM), PCMB (0.1 mM) によって何ら影響を受けなかった.

K_m および K_i の測定

Fig. 7, 8, 9 は Lineweaver-Burk¹⁵⁾ 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 $7.81 \times 10^{-3} \text{ M}$ と測定された. K_i は塩酸ベンズアミジン (2 mM), DFP (1 mM), TPCK (0.75 mM) を用い最終標品と 37°C, 15 分間保温したもの酵素液とし, 基質として TAME を用い

Fig. 7. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-3

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

Fig. 8. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-3

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

Fig. 9. Lineweaver-Burk Plots for Hydrolysis of TAME by ME-3

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

て測定した。その結果、塩酸ベンズアミジンをを用いた K_i は $0.666 \times 10^{-3} \text{ M}$, DFP をを用いた K_i は $3.66 \times 10^{-3} \text{ M}$, TPCK をを用いた K_i は $0.434 \times 10^{-3} \text{ M}$ 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, Aminoethyl-Sepharose 4 B, DEAE-Sephacel の精製操作を経てアルギニンエステル水解酵素 ME-3 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 125.7 units/mg であった。この酵素は高い基質特異性を示し、低分子合成アルギニンエステルは水解したが、リジンエステル, チロシンエステル, アルギニンアミド, カゼインなどは水解しなかった。
4. 本酵素の分子量は 33000 で、等電点は 6.93 であった。
5. 本酵素は塩酸ベンズアミジン, DFP, TPCK により阻害されるが, trasylol, EDTA, 各種トリプシンインヒビター, PCMB, システインでは阻害されなかった。
6. TAME を基質とした本酵素の K_m は $7.81 \times 10^{-3} \text{ M}$ であり、塩酸ベンズアミジン, DFP, TPCK をを用いて測定した K_i はそれぞれ、 $0.666 \times 10^{-3} \text{ M}$, $3.66 \times 10^{-3} \text{ M}$, $0.434 \times 10^{-3} \text{ M}$ であった。
7. 熱に対して安定であり、また幅広い pH 域で安定であった。
8. 本酵素は、生理活性としては毛細血管透過性亢進作用を示した。しかしキニン遊離作用, 血液凝固作用, 出血作用は認められなかった。

考 察

著者らはこれまでに蛇毒中のアルギニンエステラーゼに興味を持ち、その生化学的、生理学的作用を明らかにするために単離精製を行ってきた。すでにタイワンハブからは、毛細血管透過性亢進作用を有する ME-1 と毛細血管透過性亢進作用とキニン遊離作用を有する ME-2 を単離している。今回新たに本毒中よりディスク電気泳動, SDS ディスク電気泳動, 等電点分画で単一の毛細血管透過性亢進作用を有するアルギニンエステラーゼ

TABLE III. Comparisons of Various Properties of ME-1, 2 and 3

Property	ME-1 ^{a)}	ME-2 ^{b)}	ME-3
Molecular weight	27000	29800	33000
Isoelectric point	pH 5.95	pH 5.62	pH 6.93
Heat stability	Stable	Stable	Stable
pH stability	Wide range	Wide range	Wide range
Hexoses	3.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$	63.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Inhibition by benzamidine	+	+	+
Inhibition by DFP	—	—	+
Inhibition by TPCK	—	—	+
Substrate specificity	High	High	High
K_m (TAME)	$4.0 \times 10^{-3} \text{ M}$	$4.27 \times 10^{-3} \text{ M}$	$7.81 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_i (Benzamidine)	$0.29 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0.19 \times 10^{-3} \text{ M}$	$0.67 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_i (DFP)	/	/	$3.66 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_i (TPCK)	/	/	$0.43 \times 10^{-3} \text{ M}$
Capillary permeability-increasing activity	+	+	+
Kinin-releasing	—	+	—
Clotting	—	—	—

a) cited from *Yakugaku Zasshi*, **100**, 1035 (1980).

b) cited from *Yakugaku Zasshi*, **101**, 153 (1981).

ME-3 を単離した。ME-3 を ME-1, ME-2 と比較してみると Table III に示すようにいずれも分子量 30000 前後の耐熱性、幅広い pH 域で安定な糖タンパクである。ME-1, ME-2 とは等電点、糖含量などが異なっているが、最も大きな相違は、ME-3 は DFP で阻害されることである。これまでに分離された蛇毒のアルギニンエステラーゼはすべて耐熱性で ME-1, ME-2 以外は DFP で阻害されるセリン酵素である。今回精製した ME-3 は他の蛇毒に含まれるものと同じように活性中心にセリン残基を有するアルギニンエステラーゼである。マムシ毒のアルギニンエステラーゼは毛細血管透過性亢進作用、キニン遊離作用、血液凝固作用をそれぞれ別々の酵素が示し、1つの酵素が1つの生理活性を示している。それに反し、タイワンハブ毒から分離された3種のアルギニンエステラーゼはすべて毛細血管透過性亢進作用を有しており、この共通性の上にさらに ME-2 はキニン遊離作用も併せもっているわけである。またタイワンハブ毒には、ME-1, ME-2 のように DFP で阻害されないアルギニンエステラーゼと、ME-3 のように DFP で阻害を受けるタイプのものの2種類が存在することが明らかになった。このようなことは蛇毒アルギニンエステラーゼの中では初めての発見でタイワンハブ咬症を検討する上からも極めて興味深いことである。

引用文献および注

- 1) 第9報：杉原久義，二改俊章，二村敦子，田中哲之助，薬誌，101，153 (1981)。
- 2) 日本薬学会第101年会，熊本，1981年4月。
- 3) 杉原久義，二改俊章，二村敦子，田中哲之助，薬誌，100，1035 (1980)。
- 4) P.S. Roberts, *J. Biol. Chem.*, 232, 285 (1958)。
- 5) V. Erspamer, F. Erspamer, *Brit. J. Pharmacol.*, 19, 337 (1962)。
- 6) I. Trautschold, "Handbook of Experimental Pharmacology," Vol. 25, 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，物理化学的実験法，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.*, 1, 458 (1931)。
- 15) H. Lineweaver, D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934)。