薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (6) 655-661 (1983)

Hydroxyproline-containing Citrus Esterase (第 1 報) 精製および性質

久保田幸穂, 庄司省三,* 船越崇行, 塩永一寛, 植木 寛
熊本大学薬学部生化学教室

Hydroxyproline-containing Citrus Esterase. I. Purification and Properties of the Enzyme from *Citrus natsudaïdai* HAYATA

YUKIHO KUBOTA, SHOZO SHOJI,* TAKAYUKI FUNAKOSHI,
KAZUHIRO SHIONAGA, and HIROSHI UEKI

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto, 862, Japan

(Received November 1, 1982)

An esterase was separated from the exocarp of *Citrus natsudaïdai* HAYATA in a highly purified form. The enzyme hydrolyzes *p*-nitrophenyl esters of fatty acids, phenyl acetate, and tosylarginine methyl ester at varying rates. Of the substrates tested, *p*-nitrophenyl acetate, for which the specific activity was determined to be 18.60 units per mg of protein, was most rapidly hydrolyzed. The esterase was free from carboxypeptidase and other proteolytic activities.

The esterase had a pH optimum at pH 5.5 for *p*-nitrophenyl acetate. It was strongly inhibited by HgCl₂. The other metal ions or inorganic anions tested showed no significant effect on the enzymatic activity. The values of $S_{20,w}$ and $D_{20,w}$ were 1.8 S and $4.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectively, and the molecular weight was calculated to be 40000 from these values. The enzyme was composed of 323 amino acid residues: Trp₂, Lys₂₁, His₉, Arg₁₀, Hyp₂₃, Asp₂₄, Thr₁₈, Ser₃₅, Glu₂₂, Pro₂₀, Gly₄₀, Ala₂₂, Cys(half)₂, Val₁₈, Met₃, Ile₁₂, Leu₁₇, Tyr₁₄, Phe₁₁.

Keywords—hydroxyproline-containing esterase; hydroxyproline; citrus esterase; purification; amino acid composition; *Citrus natsudaïdai*

著者らはすでにナツミカン (*Citrus natsudaïdai* HAYATA) の外果皮から新しい型のカルボキシペプチダーゼ (CPase) を単離して CPase CN [EC 3.4.12.1] と命名し, その酵素化学的性質を明らかにした.¹⁾ CPase CN はカルボキシペプチダーゼ活性のほか弱いエステラーゼ活性を有する. このエステラーゼ作用の酵素的特徴についてはすでに報告した.²⁾

CPase CN の精製の過程において, ナツミカン外果皮抽出液の硫酸塩析およびセファデックス G-50 ゲル濾過によって得た粗酵素 (E₂) を更にジエチルアミノエチル (DEAE)-セルロース吸着カラムクロマトグラフィーによって精製する際, CPase 活性を示す吸着画分 (E₄) とは異なる非吸着画分 (E₃) が CPase CN のエステラーゼ活性よりもはるかに高いエステラーゼ活性を有することを認めた.

本研究は, この画分 (E₃) からエステラーゼを精製し, CPase CN と比較検討する目的で行った. その結果, E₃ からディスク電気泳動および超遠心的に高い均質性をもつエステラーゼを得た. このエステラーゼは CPase CN (分子量 93000) とはかなり異なり, 分子量 40000 ($S_{20,w}$, 1.8 S, $D_{20,w}$, $4.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) で, 今まで酵素タンパク質中に検出されていないヒドロキシプロリンを酵素 1 モルにつき 23 モル含むことが見出された.

実 験 の 部

酵素材料 ナツミカン果実は熊本県農業協同組合より入手した.

試薬 カルボベンゾキシル (Z)-Glu-Phe, Z-Phe-Pro, Z-Gly-Pro, Z-Pro-Pro, Z-Gly-Phe, ベンゾイル (Bz)-Gly-Lys, Bz-Gly-Arg, Bz-DL-Arg-パラニトロアニリド (pNA), トシル-アルギニンメチルエステル塩酸塩 (TAME) はペプチド研究所より入手した. DEAE-セルロース, カルボキシメチル (CM)-セルロースはセ

ルバ社製, セファデックスはファルマシア製, pNA, Gly-Gly, Gly-Gly-Gly は半井化学製, ウシ血漿アルブミンはアーマ社製, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), カゼイン, 酢酸フェニルは和光純薬製を用いた. 他の試薬および有機溶媒はすべて特級または精密分析用を使用した.

エステラーゼ活性の測定 脂肪酸の *p*-ニトロフェニルエステル, 酢酸フェニル, TAME, および *p*-ニトロフェニルリン酸を基質として用いた. なおプロピオン酸 *p*-ニトロフェニル, *n*-酪酸 *p*-ニトロフェニル, および *n*-カプロン酸 *p*-ニトロフェニルは Spasov³⁾ に従って調製した.

TAME 以外の基質はすべて 0.5% 2-プロパノールを含む 0.06 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) に 2×10^{-3} M の濃度に溶かして用いた. 基質溶液 4 ml に酵素溶液 0.2 ml を加え, 35°C で 10, 20, 30, 60 分反応させた. *p*-ニトロフェニルエステル基質^{4,5)} の場合は, 酵素反応によって遊離する *p*-ニトロフェノールを 400 nm における吸光度を測定し, 酢酸フェニル基質の場合は, 残存する基質をヒドロキサム酸鉄塩法⁶⁾ によって定量した. また TAME を基質とする場合は, 前報記載の方法²⁾ により求めた. 通常の測定では酢酸 *p*-ニトロフェニル⁴⁾ を基質として用いた. なお対照として酵素溶液のかわりに等量の 0.06 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) を加え同様に処理したものをを用いた.

上記の酵素活性測定において, 1 分間に 1 μ mol の *p*-ニトロフェノール, フェノール, あるいはメタノールを基質から遊離させるのに必要な酵素量を 1 単位とし, 比活性は酵素 1 mg あたりの単位数で表わした.

CPase 活性ならびに他の酵素活性は前報記載の方法^{1a)} に従って測定した.

タンパク質濃度の測定 タンパク質濃度は日立 101 型分光光度計を用い, 280 nm における吸光度を測定して求めた. ウシ血漿アルブミンを標準タンパク質として用いた.

ディスクおよびセルロースアセテート紙電気泳動 ディスク電気泳動は 0.03 M ベロナール緩衝液 (pH 7.0) を用い, Williams および Reisfeld,⁷⁾ Reisfeld⁸⁾ らの方法に, また SDS-ディスク電気泳動は Weber および Osborn⁹⁾ の方法に従って行った. セルロースアセテート紙電気泳動は 0.06 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) を用い, 試料 20 μ g を 2 μ l の同緩衝液に溶かし, その全量をセルロースアセテート紙 (2 $\times$ 6 cm) 上に帯状に塗布して行った. 定電流 (0.8 mA/cm) で 60 分泳動させたのち, 8% トリクロル酢酸に 0.8% の濃度に溶かしたポンソー 3R 溶液で染色した.

等電点の測定 精製酵素の等電点を久保田および植木¹⁰⁾ の方法に従い, セルロースアセテート紙電気泳動法によって測定した.

超遠心分析 超遠心による純度検定および分子量測定は日立 UCA-1A 型超遠心機を用いて行った. 精製酵素溶液を 0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) に対して 1 夜透析し, 最終濃度を 0.7% としたものを試料とした.

沈降係数の測定は標準セルを用い, 60000 rpm の回転数で, また拡散係数の測定は合成界面セルを用いて 15590 rpm の回転数で行い, 各実測値を 20°C の純水中の値に換算してそれぞれ $S_{20,w}$, $D_{20,w}$ とした.

アミノ酸分析 精製酵素 1–2 mg を 6 N HCl 1 ml に溶かし, 真空封管したのち, 110°C で 24, 48, 72 h 加水分解した. 分解液に脱イオン水を加え, 減圧下に HCl を除去して試料とした. アミノ酸およびアミノ糖の定量は日立 KLA-5 型アミノ酸自動分析計を用いて行った. なおトリプトファンの定量¹¹⁾ は紫外部吸収法によって行った. ヒドロキシプロリンの分析はアミノ酸自動分析および薄層クロマトグラフィー法¹²⁾ によって行った.

糖の分析 糖の同定は Gal¹³⁾ の方法に準じ薄層クロマトグラフィーにより行った. 精製酵素 1 mg を 3 N HCl 1 ml に溶かし, 真空封管中 105°C で 24 h 加水分解し, 分解物を脱イオン水を加えて減圧下に HCl を除去した. この加水分解物を微量の脱イオン水に溶かしてシリカゲル G type 60 (メルク社製) 薄層上に点じ, 1-プロパノール-H₂O (7:1) を用いて展開したのち, 糖をアニリン水素フタレート試薬で発色させた. 糖の定量は加水分解しない試料を用いアンスロン法¹⁴⁾ によって行った. 比色標準物質としては薄層クロマトグラフィーで検出されたグルコースを用いた.

結 果

CM-セルロースカラムによる精製

粗酵素 E₁, E₂, E₃ は前報記載の方法^{1a)} に従って調製した. ナツミカン外果皮 3113 g (果実 15.7 kg) からの E₃ の収量は 1.6 g, 0.05% であった.

E₃ 400 ml (313 mg) に 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 5.8) で緩衝化した CM-セルロース 40 g (湿重量) を加え, 同緩衝液中 4°C で 2 h 攪拌した. これをカラム (6 $\times$ 15 cm) に注ぎ, 同緩衝液で十分に洗浄した. 次に, 順次 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M のクエン酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて段階的に溶出した. 酵素活性の大部分は 0.06 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) で溶出する画分 (C₁) に認められた. E₃ 1599 mg から C₁ 683 mg (42.7%) が

Fig. 1. Elution Patterns of Fractions C_1 and C_2 on a Column of Sephadex G-100

The first gel filtration (Fig. 1A) was carried out with fraction C_1 , and the resulting active peak (C_2) was submitted to the second gel filtration (Fig. 1B). Effluent was collected in 6-ml fractions and the active fractions were pooled as indicated by horizontal bar.

Flow rate: 10 ml/h.

—x—: absorbance at 280 nm,
—O—: specific activity estimated with *p*-nitrophenyl acetate as a substrate.

得られた.

セファデックス G-100 によるゲル濾過

ゲル濾過による精製は 0.06 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) で平衡化したセファデックス G-100 カラム (4.5 × 100 cm) を用いて行った. Fig. 1A, 1B に示すように, C_1 (683 mg) からセファデックス G-100 ゲル濾過および再ゲル濾過によって活性画分 C_3 (36 mg) が得られた.

Fig. 2. CM-Cellulose Chromatography of Fraction C_3

Effluent was collected in 4-ml fractions. Enzyme was eluted with a linear gradient (1 l) between 0.01 and 0.2 M citrate buffer (pH 5.5).

Flow rate: 20 ml/h.

—x—: absorbance at 280 nm,
—O—: specific activity estimated with *p*-nitrophenyl acetate as a substrate,
.....: molarity of sodium citrate.

TABLE I. Purification of Citrus Esterase from *Citrus natsudaidai* HAYATA

Fraction	Purification procedure	Amount ^{a)} (mg)	Total activity (units)	Specific ^{b)} activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Recovery of activity (%)
E ₁ ^{c)}	Ammonium sulfate fractionation	10000	600	0.06	1	100
E ₂	Sephadex G-50 gel filtration	3513	597	0.17	3	100
E ₃	DEAE-cellulose chromatography	1599	576	0.36	6	96
C ₁	CM-cellulose chromatography	683	573	0.84	14	96
C ₂	Sephadex G-100 gel filtration	66	310	4.7	78	52
C ₃	Sephadex G-100 second gel filtration	36	241	6.7	112	40
C ₄	CM-cellulose chromatography	8	149	18.6	310	25

^{a)} Amount from 3113 g of the exocarp (15.7 kg of fruit).

^{b)} Specific activity toward *p*-nitrophenyl acetate.

^{c)} Fractions E₁, E₂, and E₃ were prepared by the method described in a previous paper.¹⁾

CM-セルロースクロマトグラフィー

画分 C₃ を 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した CM-セルロースカラム (1.5×40 cm) にのせ、0.01—0.2 M のクエン酸緩衝液 (pH 5.8—5.4) を用いて linear gradient 法により溶出した (Fig. 2)。

酵素活性は第3ピーク (画分 C₄) に認められ、比較的比活性の高い画分 (fraction Nos. 85—101) を集め、この画分を最終精製酵素 (citrus esterase) とした。Table I に citrus esterase の精製をまとめた。粗酵素 E₀ 1599 mg から精製酵素 C₄ 8 mg が得られ、またその比活性は粗酵素 E₀ の 310 倍に上昇した。

純度および分子量

Fig. 3 に示すように、本酵素は 4 mA/tube, 60 分の電気泳動でわずかに、8 mA/tube, 60 分では約 0.6 cm 陽極側へ泳動し、ほぼ単一バンドを与えた。また SDS-ディスクおよびセルロースアセテート紙電気泳動分析においても、本酵素は単一バンドを与え、これらの結果から、本酵素はほぼ均質と認められた。

超遠心分析の結果、60000 rpm 到達後 21, 39, 57 分後に本酵素の沈降界面ピークが認められ、この沈降界面は 93 分後においてもなおメニスカスより完全な分離は認められず、ピークの拡散がみられ、93 分以後の測定は行わなかった。21, 39, 57 分後の測定値より求められた沈降係数 $s_{20,w}$ は 1.8 S, 拡散係数 $D_{20,w}$ は 4.5×10^{-7} cm²/s で、これらの測定値から分子量は 40000 と算出された。なお偏比容としてはアミノ酸組成 (後述) から求めた値 0.758 ml/g を用いた。

等電点

セルロースアセテート紙電気泳動により本酵素の等電点を測定した結果、Fig. 4 に示す。曲線と横軸との交点より等電点 pH 5.4 を求めた。

最適 pH および最適温度

Citrus esterase の最適 pH は 5.5 で pH 3.5—5.5 の間で安定であるが、pH 3.5 以下および pH 6.5 以上では活性は著しく低下した。基質との反応時間 30 分の場合の最適温度は 40°C で、35°C 以下では水解速度は低く、また 45°C 以上では温度の上昇とともに酵素活性は急速に低下した。

Fig. 3. Disc Electrophoresis of Citrus Esterase

Migration was from top to bottom.
Gel : 7.0% polyacrylamide gel, pH 8.0,
Current : A, 4 mA/tube; B, 8 mA/tube,
Time : 60 min.
Staining : Amido-black 10 B,
Sample : 400 μg.

Fig. 4. Estimation of Isoelectric Point of Citrus Esterase by Cellulose Acetate Paper Electrophoresis

Sample : 8 μg of citrus esterase and 10 μg of D-glucose.
Buffer : 0.03 M citrate buffers, ionic strength 0.1.
Time : 30 min.
Staining : citrus esterase, 0.8% Ponceau 3R; D-glucose, 1% KMnO₄.
Migration caused by electrophoresis was corrected with D-glucose.

基質特異性

Table II に citrus esterase の基質特異性を示す。本酵素は用いた基質エステルのうち、酸の炭素鎖の短い酢酸 *p*-ニトロフェニルを最も速やかに水解し、次いでニトロ基のない酢酸フェニルに対し高い活性を示した。炭素鎖が長くなるに従って水解速度も遅くなり、*n*-カプロン酸 *p*-ニトロフェニルでは比活性が 0.13 に減少した。TAME に対する比活性は 0.63 でかなり低く、また *p*-ニトロフェニルリン酸に対する比活性は 0.04 で最も低かった。

2-ジペプチド基質に対する水解活性を前報記載の方法¹⁾に従って測定した結果、本酵素はこれらの基質に対し

TABLE II. Substrate Specificity of Citrus Esterase

Substrate	Specific activity (units/mg protein)	Relative ^{a)} activity (%)
<i>p</i> -Nitrophenyl acetate	18.60	100
Phenyl acetate	13.02	70
<i>p</i> -Nitrophenyl propionate	2.98	16
<i>p</i> -Nitrophenyl butyrate	0.22	1.2
<i>p</i> -Nitrophenyl carproate	0.13	0.7
TAME	0.63	3.4
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	0.04	0.2

a) Expressed as a percentage of the activity toward *p*-nitrophenyl acetate.

TABLE III. Amino Acid Composition and Calculation of the Molecular Weight of Citrus Esterase

Amino acid	Maximum value (g residue per 100 g protein)	Residues per molecule ^{a)}	Nearest integer
Trp ^{b)}	0.76	1.6	2
Lys	6.86	21.4	21
His	2.90	8.5	9
Arg	3.94	10.1	10
Hyp	7.40	22.6	23
Asp	6.99	24.3	24
Thr	4.09	17.6	18
Ser	7.67	35.2	35
Glu	8.48	21.7	22
Pro	4.88	20.1	20
Gly	5.71	40.0	40
Ala	3.97	22.3	22
Cys(1/2)	0.46	1.8	2
Val	4.37	17.6	18
Met	1.10	3.4	3
Ile	3.33	11.8	12
Leu	4.82	17.0	17
Tyr	5.51	13.5	14
Phe	3.97	10.8	11
Total	87.21	321.3	323

a) Calculation were based on a molecular weight of 4000.

b) The content of tryptophan was determined on a separate unhydrolyzed sample by the ultraviolet spectrophotometric method.¹¹⁾

て作用せず、アミノ酸の遊離は全く認められなかった。

イオンの酵素活性におよぼす影響

酵素活性に対するイオンの影響を調べた結果、本酵素は 10^{-3} M HgCl_2 によってほぼ完全に失活した。他のイオン (Li^+ , Cu^+ , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Cl^- , NO_3^-) は酵素活性に著明な変化を与えなかった。

アミノ酸および糖の組成

本酵素のアミノ酸組成を Table III に示す。Table III 中の maximum value は 6 N HCl 中、 110°C で 24, 48, 72 h 加水分解した試料について得た各アミノ酸の測定値のうち、それぞれの最大値をタンパク質 100 g あたりの g 残基数として表わしたものである。本酵素のアミノ酸残基含量の合計は 87.21% で、アミノ酸残基数より算出した分子量は 35161 であった。

薄層クロマトグラフィーによるヒドロキシプロリンの同定の結果、クロマトグラム上に 2% イサチンアセトン溶液で呈色する 2 個のスポット (R_f 0.50, R_f 0.66) が検出され、これらの値はそれぞれ標準品のヒドロキシプロリン (R_f 0.51), プロリン (R_f 0.65) の R_f 値と一致した。またアミノ酸分析の結果、ヒドロキシプロリンはアスパラギン酸の前に溶出し、その値はタンパク質 100 g あたり 7.4 g 残基で、1 モルあたりの残基数は 23 であった。

糖の同定を薄層クロマトグラフィー法で行った結果、クロマトグラム上に R_f 0.22, R_f 0.56 の 2 個のスポットを検出した。これらの値は標準品のグルコサミン (R_f 0.22), グルコース (R_f 0.55) の R_f と一致した。これに基づきアンスロン法により測定した本酵素のヘキソースの含量はグルコースとして 4.82%, アミノ酸分析計によるアミノ糖の含量はグルコサミンとして 1.57% で、これらの値とアミノ酸残基含量 (87.21%) との合計は 93.60% であった。

考

察

ナツミカン外果皮の抽出物から DEAE-セルロース吸着クロマトグラフィーによって CPase C_N を精製する際、CPase 活性のない非吸着画分にエステラーゼが含まれることを見出し、これをディスク電気泳動および超遠心的にはほぼ均質に単離した。

このエステラーゼの最適 pH は 5.5 で CPase C_N のエステラーゼ活性の最適 pH に等しく、また基質との反応時間 30 分 の場合の最適温度は 40°C で CPase C_N の最適温度 50°C より 10°C 低い。このエステラーゼの $S_{20,w}$ は 1.8 S, $D_{20,w}$ は $4.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ で、これらの値から分子量は 40000 と算出された。この分子量は CPase C_N の分子量 (93000) に比し著しく小さい。また等電点は本エステラーゼが pH 5.4, CPase C_N が pH 4.3¹⁰⁾ で、ともに酸性域にあるが、両者の値には若干の差がみられた。

本酵素は *p*-ニトロフェニルエステルのうち酸の炭素鎖の短い酢酸 *p*-ニトロフェニルをもっとも速やかに水解し、この基質に対する比活性は 18.60 unit/mg protein であった。炭素鎖が長くなるに従ってその水解速度は遅くなり、*n*-カプロン酸 *p*-ニトロフェニルでは 0.12 unit/mg protein であった。この基質特異性はアセチルエステラーゼ¹⁵⁾ の基質特異性と類似する。

また TAME に対する本酵素の比活性は 0.63 unit/mg protein で、この値は CPase C_N のこの基質に対する比活性 (0.60 unit/mg protein)²⁾ にほぼ等しい。一方本エステラーゼおよび CPase C_N の *p*-ニトロフェニルエステル水解速度はかなり異なり、エステラーゼの酢酸 *p*-ニトロフェニルに対する比活性 (18.60 unit/mg protein) は CPase C_N の同基質に対する比活性 (0.06 unit/mg protein) より約 310 倍大きい。

本エステラーゼは CPase C_N と同様に 10^{-3} M HgCl_2 によって強く阻害された。 HgCl_2 は一般にシステイン残基の SH 基、アスパラギン酸あるいはグルタミン酸残基のカルボキシル基、ヒスチジン残基のイミダゾール基と反応して酵素を阻害することが知られている。本酵素の活性にもこれらのアミノ酸残基が関与していると考えられる。

本酵素はアミノ酸 323 残基から構成されているが、その中にヒドロキシプロリン 32 残基が含まれている。本酵素タンパクにおけるヒドロキシプロリンの役割については、現在まだ明確ではないが、酵素の特異的な立体構造の保持のために必要なのではないかと推定される。

引用文献および注

- 1) a) Y. Kubota, S. Shoji, T. Funakoshi, H. Ueki, *J. Biochem.*, **74**, 757 (1973); b) *Idem, ibid.*, **76**, 375 (1974).
- 2) 久保田幸穂, 庄司省三, 船越崇行, 植木 寛, 薬誌, **94**, 964 (1974).
- 3) A. Spasov, *Ann. Univ. Sofia, II, Faculte Phys.-math.*, Liver 2, **33**, 401 (1937).
- 4) H. Zuber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 1337 (1968).
- 5) K.K. Tsuboi, P.B. Hudson, *J. Biol. Chem.*, **224**, 621 (1957).
- 6) 江幡光雄, “化学の領域増刊 34,” 生化学領域における光電比色法, 各論 2, 第 6 版, 関根隆光, 笹川泰治, 森田茂広, 木村徳次, 倉富一興編, 南江堂, 東京, 1967, p. 113.
- 7) D.E. Williams, R.A. Reisfeld, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 373 (1964).
- 8) R.A. Reisfeld, V.J. Lewis, D.E. Williams, *Nature* (London), **195**, 281 (1962).
- 9) K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- 10) Y. Kubota, H. Ueki, *J. Biochem.*, **64**, 405 (1968).
- 11) G.H. Beaven, E.K. Holiday, “Advances in Protein Chemistry,” Vol. 7, ed. by M.L. Anson, K. Bailey, and J.T. Edsall, Academic Press Inc., New York, 1952, p. 319.
- 12) 石川正幸, 原 昭二, 古谷 力, 中沢泰男, “薄層クロマトグラフィー,” 南山堂, 東京, 1963.
- 13) A.E. Gall, *Anal. Biochem.*, **24**, 452 (1968).
- 14) 阿武喜美子, 瀬野信子, “糖質実験法,” 生物化学実験法 XI (蛋白質核酸酵素別冊) 共立出版, 東京, 1968.
- 15) R.J.W. Byrde, A.H. Fielding, *Biochem. J.*, **61**, 337 (1955).