



Title	水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究 : エゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉中のUDP誘導体の分離同定について
Author(s)	西田, 清義
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 17(4), 193-206
Issue Date	1967-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23290
Type	bulletin (article)
File Information	17(4)_P193-206.pdf



Instructions for use

水産動物筋肉中の有機リン酸化合物に関する研究 XIX

エゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉中の
UDP 誘導体の分離同定について

西田清義*

Studies on the Organic Phosphates in the Muscles of
Aquatic Animals XIX

Isolation and identification of UDP-derivatives
in the muscles of abalone and squid

Kiyoyoshi NISHITA*

Abstract

Acid-soluble extracts of the muscles of abalone and squid were fractionated with barium acetate, and nucleotides in the barium non-precipitated fraction were separated and identified as UDP-*N*-acetylglucosamine, UDP-*N*-acetylgalactosamine, UDP-glucose, and UDP-galactose.

Furthermore, the approximate amounts of UDP-*N*-acetylhexosamine and UDP-hexose, and the ratios of UDP-*N*-acetylglucosamine to UDP-*N*-acetylgalactosamine were determined.

結 言

著者は先にエゾアワビ筋肉中の酸可溶核酸成分について検討して報じた⁽¹⁾が、その際ごく微量の成分として 1~2 種の UDP 誘導体の存在を確認した。水産無脊椎動物筋肉から UDP 誘導体を分離した例として、最近 V. Wylie et al.⁽²⁾ は Pacific oyster からイオン交換セルローズによって UDPAG を認めたと報告があるが、そのほかには見られないようである。著者は今回エゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉を多量に使って UDP 誘導体を分離同定したのでその結果を報告する。

* 北海道大学水産学部水産化学教室
本報告において次の略称を使用する。

- UDP : Uridine diphosphate
UDPAH : Uridine diphosphate-*N*-acetylhexosamine
UDPAG : Uridine diphosphate-*N*-acetylglucosamine
UDPAGal: Uridine diphosphate-*N*-acetylgalactosamine
UDPH : Uridine diphosphate hexose
UDPG : Uridine diphosphate glucose
UDPGal : Uridine diphosphate galactose
ADP : Adenosine diphosphate

実験材料および方法

材料：核酸系試薬は前報⁽¹⁾に記載したもののほかに UDPAG, UDPG (Sigma Chem. Co.) を使用した。

N-アセチルグルコサミン (東京化成工業株式会社), グルコース, ガラクトース, マンノース (和光純薬株式会社), ガラクトサミン (生化学工業株式会社)。

N-アセチルガラクトサミンは Roseman et al. の方法⁽²⁾によってガラクトサミンから合成した。

グルコサミンは *N*-アセチルグルコサミンを 2*N* 塩酸で 100°C 3 時間封管中で加熱して脱アセチル化を行なって調製した。

エゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) は函館近海産で水揚げ後数時間以内の生きているものを昭和 40 年 9 月初旬に市場から求め、前報⁽¹⁾と同様に処理して、筋肉部 550 g を得た。またスルメイカ (*Todarodes pacificus*) は同年 10 月中旬に函館近海で捕獲して蓄養しているものから捕獲後数時間以内のものを求め、表皮、内臓を除去した胴筋肉部 620 g を得た。

方法：

(1) 抽出方法 筋肉重量の 2 倍の容量の 0.6 *N* 過塩素酸でホモジェナイズ抽出後、筋肉残渣を等量の 0.6 *N* 過塩素酸でホモジェナイズし、前報⁽¹⁾の抽出方法に準じて抽出液を調製した。抽出液はそのままイオン交換分析に供せず、一度バリウム分別を行なった。即ち抽出液を 6 *N* 水酸化カリウムで pH 8.2 に調整しつつ 25% 酢酸バリウム溶液 100~250 cc を添加して 0°C に一夜放置し、多量に存在する ATP, ADP などの主として遊離の多磷酸塩をバリウム塩として沈澱させて除去した。上澄液は塩酸で pH 3~4 として活性炭カラム (和光純薬株式会社, クロマトグラフィー用活性炭 40~45 g, φ 5.0 cm×15 cm) に通してヌクレオチドを吸着させた。次いで活性炭カラムを水洗してから、*M*/100 EDTA 溶液 (1 *M*-炭酸ナトリウムで pH 7 に調整) を約 500 cc 流し^(4,5), 再び水洗した。続いてアンモニア性アルコール (エタノール:濃アンモニア水:水=50:2:48v/v/v) で溶出液に 260 mμ の吸収がほぼなくなるまで溶出を行ない (約 2*l*), 溶出液は順次手早くロータリーエバポレーターで 25°C 以下で減圧濃縮してアルコールを留去した。このようにして得た溶液を Barium non-precipitated fraction としてイオン交換クロマトグラフィーに供した。

ヌクレオチドのバリウム塩は *N*/10 塩酸 100 cc で溶解し、遠心分離を行なって上澄液を集める。沈澱はさらに同濃度の塩酸 50 cc で 2 回溶解させた。上澄液は一緒に合わせて Dowex 50 WX 8 (H⁺, φ 7.5 cm×10 cm または φ 2.0 cm×25 cm) に通してバリウムを除去し、続いてカラムを 260 mμ の吸収がなくなるまで水洗する。通過液および水洗液を合わせて 6 *N* 水酸化カリウムで pH 6.5 に調整してイオン交換クロマトグラフィーに供した。

(2) ペーパークロマトグラフィー 核酸系物質のペーパークロマトグラフィーはあらかじめ 2 *N* 酢酸で洗浄した東洋濾紙 No. 3 で次の展開液を使用して行なった。

(1) Ethanol-*M*. ammonium acetate (pH 7.5) [75:30 v/v] 下降法

(2) Ethanol-*M*. ammonium acetate (pH 3.8) [75:30 v/v] 下降法

糖のペーパークロマトグラフィーは東洋濾紙 No. 50 を使用し、次の展開剤で行なった。

(3) *n*-Butanol-pyridine-water [6:4:3 v/v/v] 通常は下降法によった。グルコース, ガラクトースの分離のためには上昇法, 二重展開を行なった。

(4) Ethylacetate-pyridine-water [2:1:2 v/v/v] 下降法

(5) Ethylacetate-acetic acid-water [3:1:3 v/v/v] 下降法

(6) *n*-Butanol-ethanol-water [4:1:1 v/v/v] 下降法

(7) Phenol satd. water 上昇法

(8) Ethylacetate-pyridine-28% ammonium hydroxide-water [10:5:3:3 v/v/v] 下降法
N-アセチルヘキソサミンを相互に分離させるために、東洋濾紙 No. 50 をホウ酸緩衝液 (0.2 M Boric acid-sodium tetraborate buffer, pH 8.2) で処理してから使用した⁽⁶⁾。

糖類の検出は Anilin hydrogen phthalate で行なった。

(3) UDP 誘導体から糖成分とヌクレオチド成分の分離

UDP 誘導体の N/100 塩酸溶液を 100°C, 10 分間加熱することによって糖成分を遊離させた⁽⁶⁾。この分解液を活性炭カラムに通してヌクレオチドを吸着除去し、通過液をさらに Dowex 50 W-X 8 (H⁺, φ 1.1 cm×3 cm), Amberlite IR-4B (Cl⁻, φ 1.1 cm×3 cm) を通過させて精製した。こうして得た糖成分の溶液をデシケーター中で水酸化ナトリウムの存在のもとで、濃縮乾固を繰返して塩酸を除去した。また、活性炭カラムに吸着したヌクレオチド成分はアンモニア性アルコールで溶出し、ロータリーエバポレーターで 25°C 以下で減圧濃縮した。

(4) N-アセチルヘキソサミンの脱アセチル化

N-アセチルヘキソサミンの溶液を 2 N 塩酸中で 100°C, 3 時間封管中で加水分解した。分解液はデシケーター中で水酸化ナトリウム存在下で濃縮乾固を繰返して塩酸を除去した。

(5) ヘキソサミンのニンヒドリン酸化

ヘキソサミンを濾紙にスポットとして供試し、ニンヒドリンとピリジンの混合溶液を噴霧して酸化を行ない、生成したペントースをペーパークロマトグラフィーで同定した⁽⁷⁾。

(6) N-アセチルグルコサミンおよび N-アセチルガラクトサミンの分別定量

ホウ酸処理した濾紙に N-アセチルヘキソサミンの混合物を帯状に供試し、展開剤 (3) でペーパークロマトグラフィーを行なって両者を分離した。ガイドストリップを用いて、糖の位置を確認したのち、濾紙から糖部分を切りとって細切りにし、一定容量の蒸溜水で二昼夜室温で抽出した。抽出液について J. L. Reissig et al. の方法⁽⁸⁾を用いて比色定量した。標準の N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミンを使用して、濾紙からの回収試験を行ない、前者では 102.0%、後者では 93.3% と良好な結果を得た。

実験結果

エゾアワビ筋肉 550 g の Barium non-precipitated fraction のイオン交換溶出図のうち前報⁽¹⁾において UDP または UDP 誘導体が溶出されて来た部分を Fig. 1 に示した。またスルメイカ筋肉 620 g の溶出図を Fig. 2 に示した。これらの溶出図の Peak E は ADP であることが確認されたが、Peak D の前半の部分は紫外線波長での吸光度比から Uracil nucleotide であることが推定された。アワビ筋肉の Peak D を再クロマトグラフィーした結果 Fig. 3 に示した通り Peak a, b, c の 3 成分に分別された。また、スルメイカ筋肉の Peak D も同様に再クロマトグラフィーによって a~c の 3 成分に分離された (Fig. 4)。

エゾアワビ筋肉成分 a の紫外線吸収スペクトルは pH 2 で λ max. 263 mμ, λ min. 231 mμ であり、臭素化によってその特異的吸収スペクトルは完全に消失した (Fig. 5)。

エゾアワビ筋肉成分 b, スルメイカ筋肉の a, b の吸収スペクトルも、これとまったく同じ形を示し、いずれも Uracil nucleotide であることが判明した。各成分の全リン酸、リボースの測定結果は Table 1 に示した。

エゾアワビ筋肉成分 a および b を標準 UDP とともにペーパークロマトグラフィーを行なった結

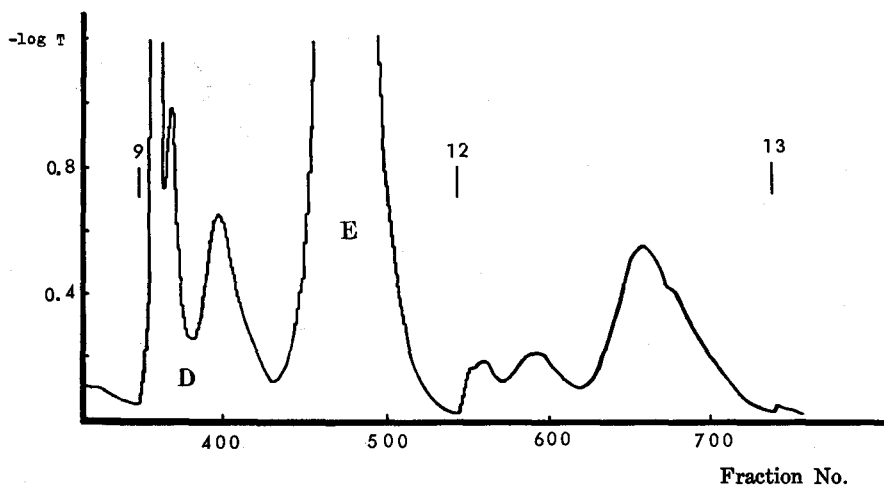


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the barium non-precipitated fraction (abalone)

Exchanger: Dowex 1X8-formate, 100-200 mesh, ϕ 2.0 cm \times 20 cm

Eluting solution: (9) 0.1 M Formic acid (F. A.), 0.3 M Sodium formate (S. F.)

(12) 0.1 M F. A., 0.7 M S. F.

(13) 0.1 M F. A., 1.0 M S. F.

Flow rate: 1-1.5 ml./min.

Each fraction contains 20 ml.

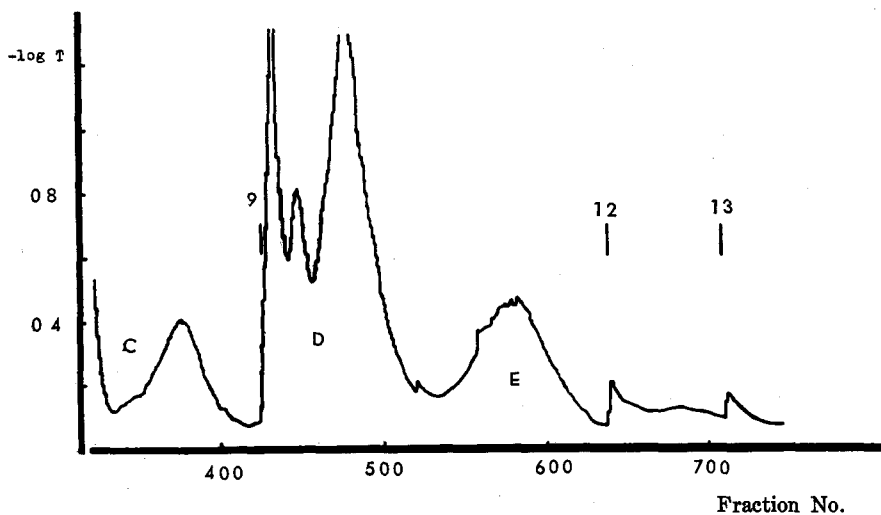


Fig. 2. Ion-exchange chromatography of the acid-soluble nucleotides in the barium non-precipitated fraction (squid)

Experimental conditions are the same as in Fig. 1

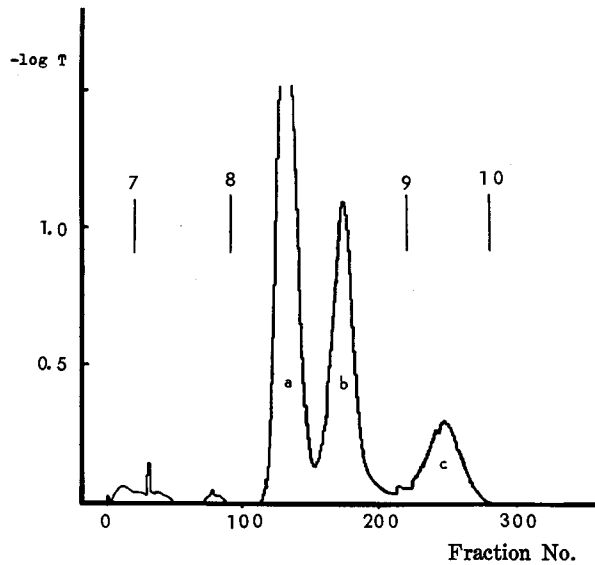


Fig. 3. Rechromatography of the *D*-fraction of the muscle of abalone

Exchanger: Dowex 1X8-formate, 100-200 mesh, ϕ 1.1 cm \times 25 cm

Eluting solution: (7) 0.1 *M* F. A., 0.1 *M* S. F.

(8) 0.1 *M* F. A., 0.2 *M* S. F.

(9) 0.1 *M* F. A., 0.3 *M* S. F.

(10) 0.1 *M* F. A., 0.4 *M* S. F.

Each fraction contains 10 ml.

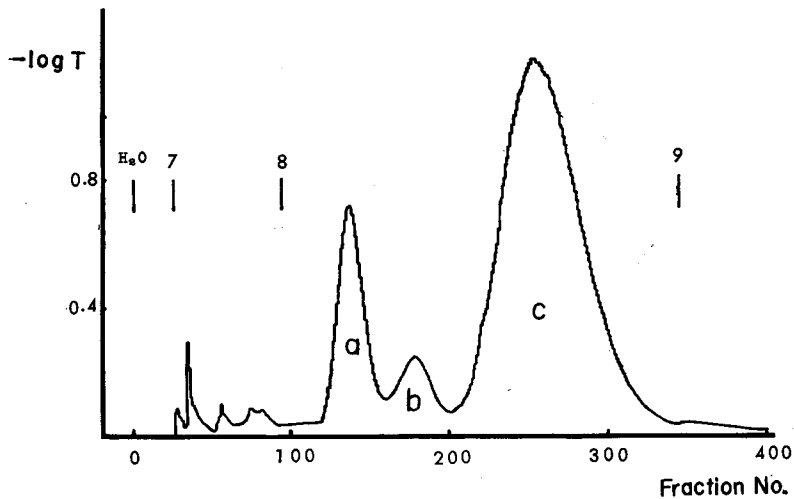


Fig. 4. Rechromatography of the *D*-fraction of the muscle of squid

Experimental conditions are the same as in Fig. 3

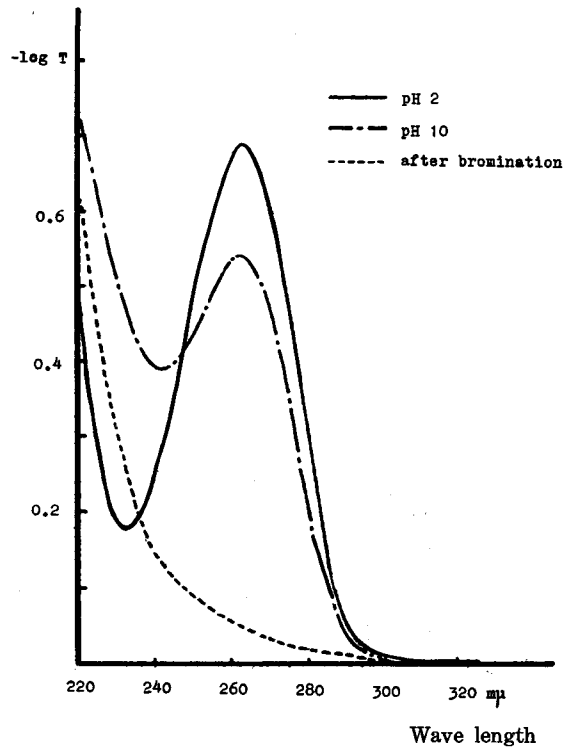


Fig. 5. Ultra-violet absorption spectra of substance a (abalone)

Table 1. Chemical analysis of nucleotides isolated from the muscles of abalone and squid

	Molar ratio		
	Uracil	Total-P	Ribose
Abalone a	1.00	2.05	—
b	1.00	1.91	—
Squid a	1.00	1.86	0.71
b	1.00	1.83	1.06

Table 2. $R_{adenosine}$ values of nucleotides isolated from the muscle of abalone

Substance	a	b	Auth. UDP
$R_{adenosine}$	0.81	0.61	0.20

Solvent 1: Ethanol-*M* ammonium acetate, pH 7.5 (75:30)

果いずれも標準 UDP と明らかに R_f が異なることから、両成分とも UDP 誘導体であることが示唆された (Table 2)。そこで糖成分を検索するためにエゾアワビ筋肉成分 a および b を $N/100$ 塩酸で 100°C , 10 分間加熱して糖成分を遊離させた後, 加水分解液をデシケーター中で乾固してグルコース, ガラクトース, マンノース, N -アセチルグルコサミン, リボース, キシロースと共に展開剤 (3) でペーパークロマトグラフィーを行なって予備的に比較した。その結果 R_f と発色した色調から

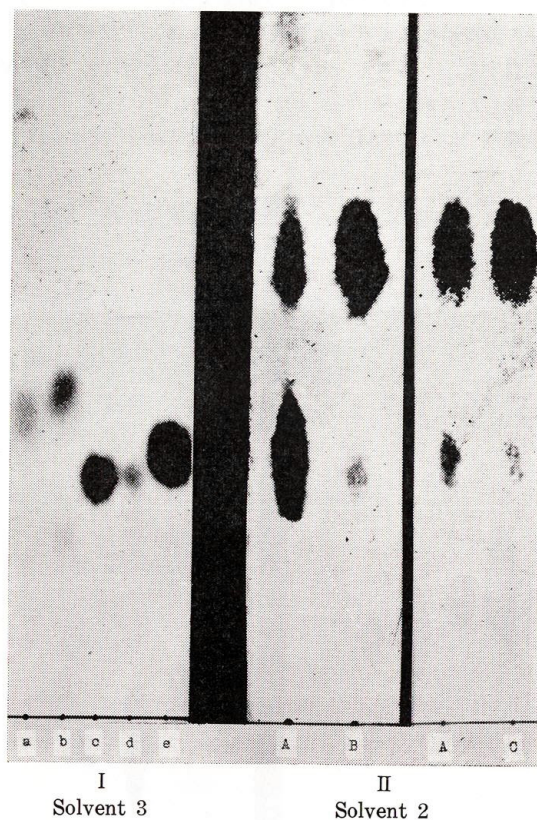


Fig. 6. Paperchromatography of degradation products obtained by mild acid hydrolysis

- (I) Sugar moiety
 a ...Auth. N -acetylglucosamine
 b ...Obtained from substance a (abalone)
 c ...Auth. glucose
 d ...Obtained from substance b (abalone)
 e ...Auth. mannose
- (II) Nucleotides
 A ...Auth. UMP (upper) and UDP (lower)
 B ...Obtained from substance a (squid)
 C ...Obtained from substance a (abalone)
 Solvent 2: Ethanol- M ammonium acetate, pH 3.8 (75:30)
 Solvent 3: n -Butanol-pyridine-water (6:4:3)

成分 **a** の糖成分は *N*-アセチルグルコサミン, 成分 **b** のそれはグルコースであると推定された (Fig. 6-I)。さらに成分 **a** の糖について濾紙上で Elson-Morgan 反応⁽⁹⁾を試み, Erlich 試薬だけで紫色に発色したことから *N*-アセチルアミノ糖であることが確認された。この分解物中のヌクレオチド成分もまたペーパークロマトグラフィーで検討し, 標準の UMP と UDP に完全に一致する 2 個のスポットが得られた (Fig. 6-II)。

従って, エゾアワビ筋肉成分 **a** は UDPAG, 成分 **b** は UDPG であることが示唆され, またイオン交換クロマトグラフィーの態度からスルメイカ筋肉成分 **a** はエゾアワビ筋肉成分 **a** に, 同成分 **b** はエゾアワビ筋肉成分 **b** に相当することが考えられたので, 各成分を標準の UDPAG, UDPG とペーパークロマトグラフィーで比較した (Fig. 7, Fig. 8)。

しかしながら, この展開剤では UDPAH 間の相互分離或いは UDPH 間の相互分離は行なわれな

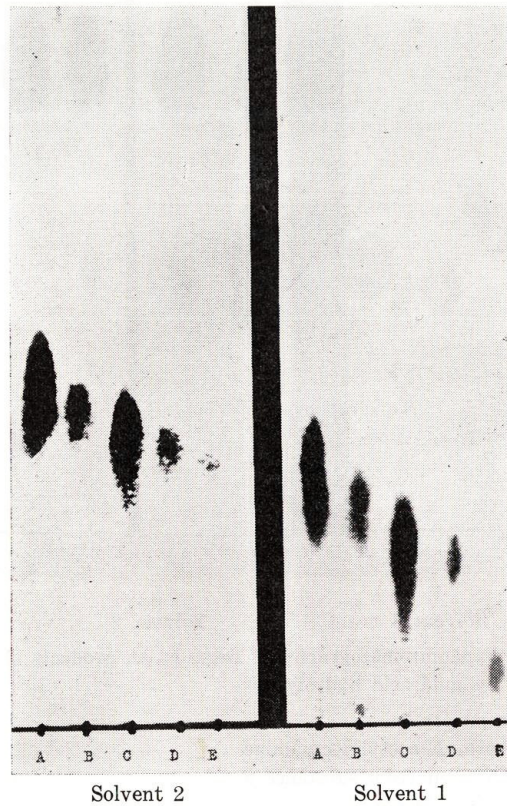


Fig. 7. Paperchromatography of substances a and b (abalone)

- A...Substance a
- B...Auth. UDPAG
- C...Substance b
- D...Auth. UDPG
- E...Auth. UDP

Solvent 1: Ethanol-*M* ammonium acetate, pH 7.5 (75:30)

Solvent 2: Ethanol-*M* ammonium acetate, pH 3.8 (75:30)

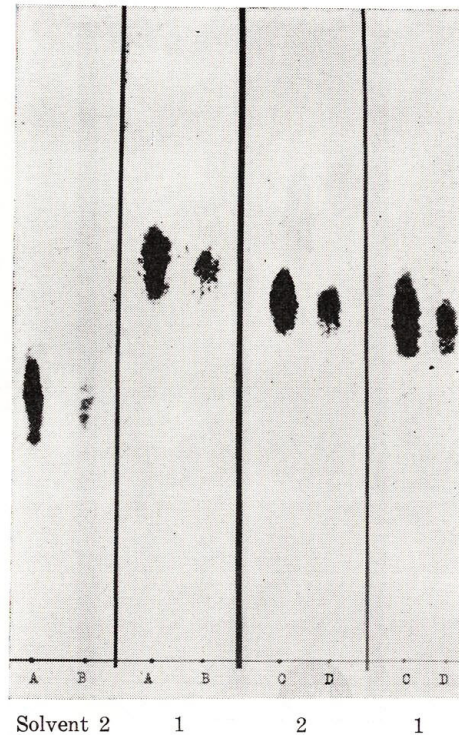


Fig. 8. Paperchromatography of substances a and b (squid)
 A...Substance a C...Substance b
 B...Auth. UDPAG D...Auth. UDPG

いので、さらに糖成分を詳細に検討することによってそれらが単一成分であるか混合物であるかを調べた。

まず、エゾアワビ筋肉の成分 a の糖成分を 4 種類の展開剤で *N*-アセチルグルコサミンとペーパークロマトグラフィーで比較して Fig. 9 に示した。図からわかるように展開剤 (4), (5) で展開したクロマトグラムでは試料の方が標準物質よりもやや低くなる傾向を有しており、混合物であることを暗示している。

この糖成分をホウ酸処理した濾紙で 2 種溶媒を使用してペーパークロマトグラフィーを行ない、またスルメイカ筋肉成分 a の糖成分についてもまったく同様に展開して Fig. 10 に示した。

この結果から両者とも *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルガラクトサミンの混合物であることがわかる。なお、この両スポット以外に下方に見られる 1~2 個のスポットは一部脱アセチルによって生じたグルコサミンとガラクトサミンである。また成分 a の糖を脱アセチルしてから標準のグルコサミンとガラクトサミンと共に濾紙に供試し、これを濾紙上でニンヒドリン酸化した後、展開剤 (3), (6) で展開してグルコサミン、ガラクトサミンから生ずるペントースに比較した (Fig. 11)。

この結果からもエゾアワビ、スルメイカ両筋肉の成分 a の糖は *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルガラクトサミンの混合物であることが確認された。

これらの糖混合物を分別定量した結果、*N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルガラクトサミンの

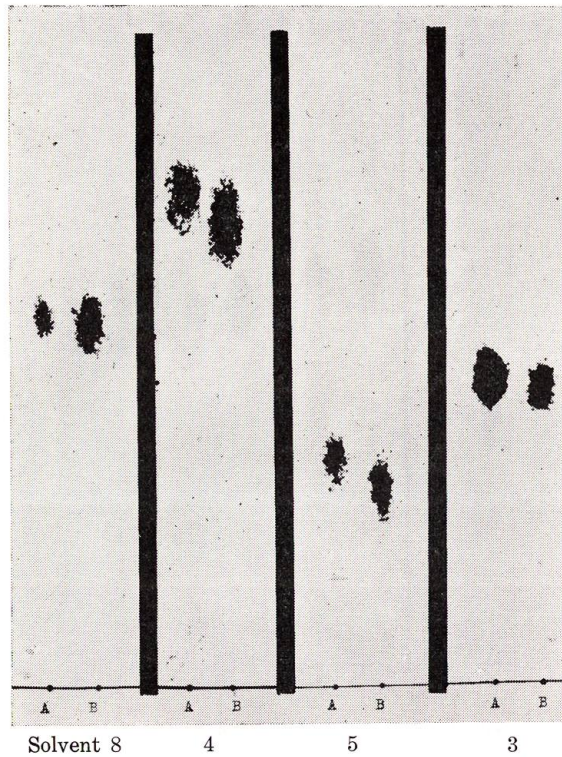


Fig. 9. Paperchromatography of sugar moiety obtained from substance a (abalone)

A...Auth. *N*-acetylglucosamine

B...Obtained from substance a (abalone)

Solvent 3: *n*-Butanol-pyridine-water (6:4:3)

Solvent 4: Ethyl acetate-pyridine-water (2:1:2)

Solvent 5: Ethyl acetate-acetic acid-water (3:1:3)

Solvent 8: Ethyl acetate-pyridine-28% ammonium hydroxide-water (10:5:3:3)

混合比はエゾアワビ筋肉で 2.1:1.0, スルメイカ筋肉で 1.9:1.0 であった。以上の結果エゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉の成分 a は UDPAG と UDPAGal の混合物であることが確認された。

エゾアワビ, スルメイカ両筋肉の成分 b から糖成分を遊離して活性炭, イオン交換樹脂で精製した後, 標準のグルコース, ガラクトース, マンノースと共に, ペーパークロマトグラフィーで比較した (Fig. 12, Fig. 13)。この結果から両者の成分 b の糖はともにグルコースとガラクトースの混合物であり, グルコースが主成分であることがわかる。従ってエゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉の b 成分は UDPG と UDPGal の混合物であり, 前者が主成分であることが確認された。

Fig. 3 および Fig. 4 の成分 c は紫外線吸収スペクトルがアデノシン型であり, アデニン, 全リン酸, 不安定リン酸, リボースのモル比が約 1:2:0:2 であり, また溶出位置からも ADP-ribose であると考えられるが詳細なことは目下検討中である。

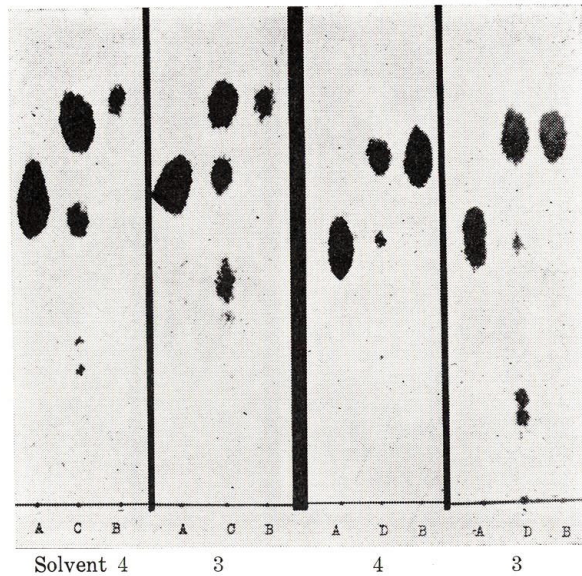


Fig. 10. Paperchromatography of sugar moiety by means of borate-treated paper

A...Auth. *N*-acetylgalactosamine B...Auth. *N*-acetylglucosamine
 C...Obtained from substance a (squid) D...Obtained from substance a (abalone)

考 察

エゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉中の酸可溶性成分の中、特に生体内における重要な代謝中間体である **Nucleotide-sugar** として UDP 誘導体の検討を行なった。一般にこれらの動物筋肉中においては ATP, ADP, AMP などのヌクレオチドが多く^(1,10), 殊に遊離の多磷酸塩が主要な成分となっていて、これが微量の成分の検討を妨げている一つの大きな原因ともなっていると考えられる。

Nucleotide sugar は水溶液からバリウム塩として沈澱しないことから、筋肉抽出液をイオン交換分析に供する前にあらかじめ多磷酸塩の大部分をバリウム塩として取り除き、上澄液を活性炭処理した後イオン交換クロマトグラフィーを行なった。この活性炭処理の際に EDTA 処理することによって **Nucleotide-sugar** はほぼ定量的に回収されるという報告があり^(4,5), 本実験においても同処理を行なった。

イオン交換分析の結果から UDP 誘導体の含有量を概算して Table 3 に示した。この結果から UDP 誘導体の含有量は、エゾアワビ筋肉ではスルメイカ筋肉の約 3 倍であり、両者とも UDPAH の方が UDPH より多いことがわかる。しかし一般の哺乳動物の各組織^(11,12) に比較して、かなり含有率が低いことが推察される。

エゾアワビ筋肉のこれらのヌクレオチド含有量をエゾアワビ肝臓⁽¹³⁾のそれと比較すると、UDPAH は肝臓の約 1/6 であるが、UDPH は肝臓中においては痕跡程度しか認められていない。このことは貝の肝臓はグリコーゲンの貯蔵所とはなり得ないとする足利の研究⁽¹⁴⁾を裏づけるものでないかと考えられる。

UDPH が行動の緩慢なエゾアワビ筋肉に多く、活動的なスルメイカの筋肉さらにはエゾアワビ肝臓に少ないということは、これが本来の性質であるのか或いは食餌の摂取状況または捕獲前の生理的状況による影響なのかは不明である。

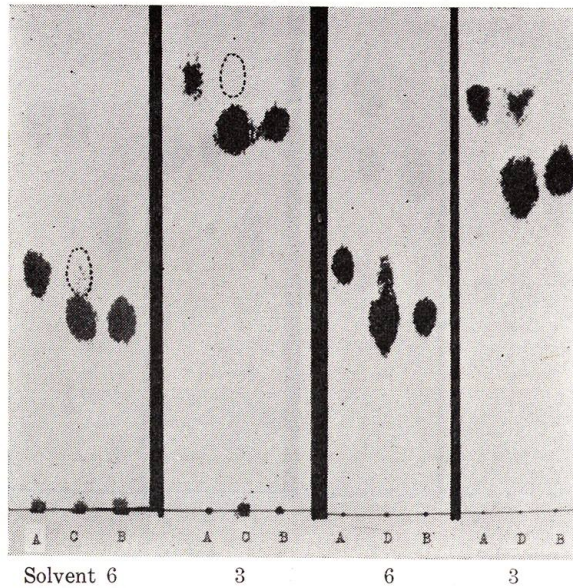


Fig. 11. Paperchromatography of pentose obtained by ninhydrin oxidation

- A...Pentose from auth. galactosamine
 B...Pentose from auth. glucosamine
 C...Pentose from deacetylated sugars of substance a (squid)
 D...Pentose from deacetylated sugars of substance a (abalone)
 Solvent 3: *n*-Butanol-pyridine-water (6:4:3)
 Solvent 6: *n*-Butanol-ethanol-water (4:1:1)

UDPAH の糖成分はエゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉ともに *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルガラクトサミンが約 2:1 の割合で混合している結果が得られ、牛肝臓⁽¹³⁾に於いても同じ結果が示されていることから各種動物組織中でのこれらの成分の混合比、強いては関連酵素系の相異についても興味をもたれる。

著者らは、これらの *Nucleotide derivatives* は筋肉の解糖作用または生体組織の合成分解過程にきわめて重要な意味をもつという観点から、さらに各種の動物あるいはそれらの種々な組織中でのその種類と含有量の決定およびその生成、分解の機構を究めてその生化学的意義を明らかにしたいと考えている。

要 約

エゾアワビ筋肉およびスルメイカ筋肉の過塩素酸抽出液の Barium non-precipitated fraction を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分析し、各々の筋肉から UDPAG, UDPAGal, UDPG, UDPGal を同定した。

また UDPAH と UDPH の含有量を概算するとともに UDPAH の画分の UDPAG と UDPAGal の量比を測定した。

本研究は齋藤恒行教授の御指導の下で行なった。ここに深く感謝する。また多くの有益な御助言を頂いた新井健一助手に厚く感謝する。

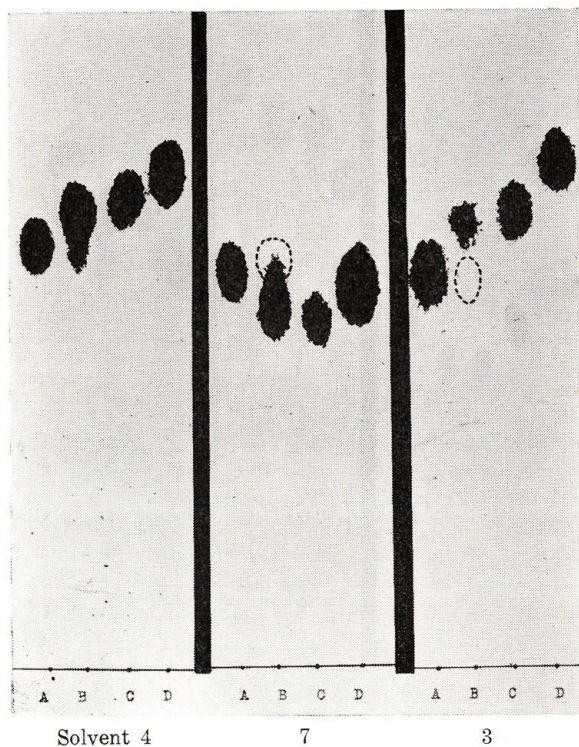


Fig. 12. Paperchromatography of sugar moiety obtained from substance b (abalone)

- A...Auth. galactose
- B...Obtained from substance b
- C...Auth. glucose
- D...Auth. mannose
- Solvent 3: *n*-Butanol-pyridine-water (6:4:3)
- Solvent 4: Ethyl acetate-pyridine-water (2:1:2)
- Solvent 7: Phenol satd.-water

Table 3. Nucleotide content in the muscles of abalone and squid

(μ moles/100 g. wet wt.)

	Abalone	Squid
UDPAH	6.1	2.4
(UDPAG)	(4.1)	(1.6)
(UDPAGal)	(2.0)	(0.8)
UDPH	3.9	1.1

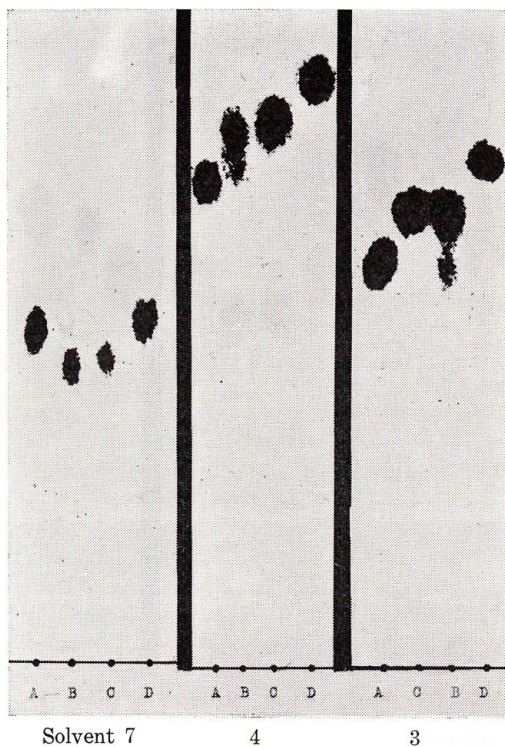


Fig. 13. Paperchromatography of sugar moiety obtained from substance b (squid)

A...Auth. galactose B...Obtained from substance b
C...Auth. glucose D...Auth. mannose

文 献

- 1) 西田清義・新井健一・斎藤恒行 (1966). 北大水産彙報 **17**, 139.
- 2) Wylie, V. and Smith, M. (1964). *Can. J. Biochem.* **42**, 1347.
- 3) Roseman, S. and Ludowieg, J. (1954). *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 301.
- 4) Pontis, H. G., Cabib, E. and Leloir, L. F. (1957). *Biochim. Biophys. Acta.* **26**, 146.
- 5) 中村道徳 (1961). 酵素研究法 Vol. 4, p. 533, 東京; 朝倉書店.
- 6) Cabib, E., Leloir, L. F. and Cardini, C. E. (1953). *J. Biol. Chem.* **203**, 1055.
- 7) 阿武喜美子・瀬野信子 (1957). 実験化学講座 Vol. 23, p. 388, 東京; 丸善株式会社.
- 8) Reissig, J. L., Storominger, J. L. and Leloir, L. F. (1955). *J. Biol. Chem.* **217**, 959.
- 9) 阿武喜美子・瀬野信子 (1957). 実験化学講座 Vol. 23, p. 388, 東京; 丸善株式会社.
- 10) 新井健一 (1966). 日水誌 **32**, 174.
- 11) Long, C. (1961). *Biochemist's Handbook* p. 792. London; E. & F. N. Spon Ltd.
- 12) Donath, R. (1964). *Z. Physiol. Chem.* **337**, 1.
- 13) 関 伸夫・新井健一・斎藤恒行 (1966). 北大水産彙報投稿中.
- 14) 足利千枝 (1957). 大阪市衛生研 **19**, 110.
- 15) Pontis, H. G. (1955). *J. Biol. Chem.*, **216**, 195.