HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シロサケ(Oncorhynchus keta)血清遊離アミノ酸の遡上前後における量的変動
Author(s)	米田, 勤; 石原, 義雄
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 26(2), 192-200
Issue Date	1975-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23558
Type	departmental bulletin paper
File Information	26(2)_P192-200.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
26(2), 192–200. 1975.

シロサケ (*Oncorhynchus keta*) 血清遊離アミノ酸の遡上前後における量的変動

米田 勤*・石原義雄*

On Serum Free Amino Acids of Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*, Changes of Amino Acid Contents of the Salmon Sera before and after Fresh Water Migration for Spawning

Tsutomu YONEDA* and Yoshio ISHIHARA*

Abstract

Concerning the fluvial migrating of salmon, which is known to be fasting, the free amino acid levels were compared for two kinds of fish groups; one fish group was caught in sea water about a mile offshore in October and the other in fresh water before spawning in December.

The author found that seven amino acids (alanine, threonine, serine, isoleucine, valine, glycine and leucine) had decreased and two amino acids (aspartic acid and phenylalanine) had increased in the fresh water group of salmon. The differences in the contents of these nine amino acids were regarded as significant by means of the U-test of Mann-Whitney[27]. Particularly the significance of alanine contents was remarkable. With regard to the described amino acids, especially in alanine, some possible functions were discussed.

緒　　言

血液は動物の生理状態を観察するための極めて好適な材料であり，殊に尿の採集のむづかしい魚類においてはこれに優るものはない。そして遊離アミノ酸(FAA)は単に蛋白質の素材にとどまらず，個々のアミノ酸が個有の化学構造に起因する生理機能を有するもので，その生体内における消長の追跡は重要である。

アミノ酸の生理機能と云う観点から進められた研究は少なく[1]，高等動物においても微生物においても主に代謝の面から取上げられその地図の主な系はこれを触媒する酵素量や酵素の動力学的解析とトレーサーの手法により描かれている[2,3]。

アミノ酸の生理機能については1951年 Florkin らにより osmoregulatory[4] が指摘されたことに始まっているようである。その後 Lewis が甲殻類神経組織のジカルボン酸が内部カリウムイオン濃度とバランスを保っていること[5]，Allen らが淡水産二枚貝にはタウリンが存在しないこと[6]，Lange が数種のアミノ酸特にタウリン濃度が環境水塩濃度と正の相関を持つことを報告した[7]。そして Lynch がカキ[8]，Webb[9,10] や Cook ら[11] がアメフラシでそれぞれ FAA プール，NPS (Ninhydrin positive substance) 或は FAA 中の特定のアミノ酸（タウリン，アラニン，グリシン，プロリン，

* 北海道大学水産学部水産高分子化学講座 (*Laboratory of Polymer Chemistry of Marine Products, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

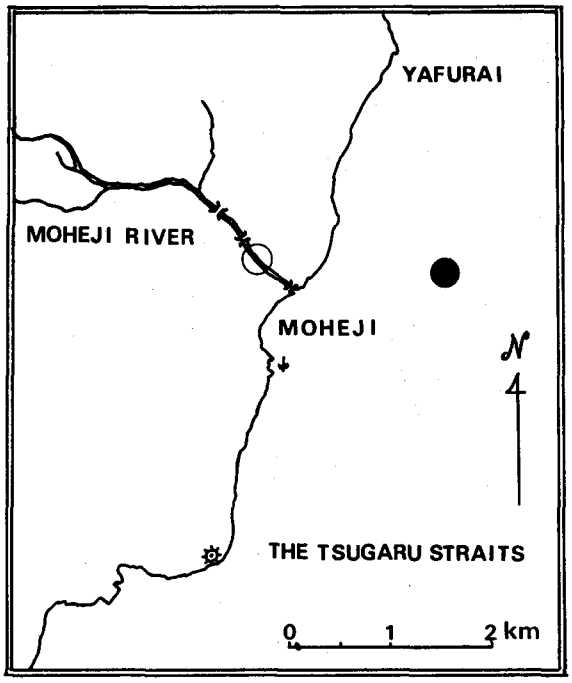

Fig. 1. The sampling stations of the chum salmon of Moheji in Hokkaido symbolized by circles.

アスパラギン酸，アルギニン）が環境水塩濃度の変化に応じてその濃度を変え，環境水温の変化にも対応することを報告している。また爬虫類[12-16]については Coulson と Hernandez がトレーサーによる代謝の研究を行い特定のアミノ酸（アラニン，セリン，グルタミン酸，グリシン）の濃度保持が生理的意義を有することを論じている。

魚類の FAA，殊にその血清 FAA についての報告は余り多くなく，Serfaty らがコイの血液で 12 種類の FAA を定量し[17,18]，Cowey と Daisley が大西洋サケの血漿 FAA を[19,20]，最近では Wuson と Poe[21] が米国産ナマズの血清 FAA を定量したものと，Mehrle[22] が有機塩素系農薬がもたらす代謝異常を血清 FAA の濃度変化で捕えようとしたものがある程度である。

本報はシロサケのライフサイクルに伴うアミノ酸および蛋白質の変化についての研究の一端として，先に行った血清蛋白のディスク電気泳動[23]と平行して行われた，ガスクロマトグラフィーによる血清 FAA の定量分析である。産卵のため母川回帰するシロサケが沿岸に接近する頃にはすでに絶食状態にあることに着目し，その血清 FAA を海水域と淡水域で捕獲したシロサケの各グループで比較し，特定のアミノ酸が顕著な差を示すことを見いだし，生理および環境の変化に伴ってその濃度が変動するこれらのアミノ酸のはたす役割の考察を試みた。尚，サクラマスについては淡水池飼育と海水槽飼育の血清FAAの比較を行ない，明確な差は認められなかったが，シロサケとの比較のために記載する。

試料および方法

試料および試薬

シロサケ (*Oncorhynchus keta*) は 1968 年函館近郊の茂辺地川（図 1）に母川回帰したもののうち，

10月に海水域で捕獲した雌雄各4尾と12月に淡水域で捕獲した雌雄各4尾の合計16尾で，鰓動脈から個体別に採血し振動を避け速やかに実験室に持ち帰り自然凝固を待って血清を分離した。サクラマス(*Oncorhynchus masou*) は 1973年12月北大水産学部七飯養魚場から分与されたもので海水槽に移してから3ヶ月経過したギンケ3尾と淡水池で飼育した当年魚4尾の合計7尾の雌で，尾柄部を切断して毛細管で採血し，遠心分離を行ってからドライアイスで凍結して実験室に持ち帰った。分析を行う迄の数日間血清試料を−20°C のストッカー中に凍結保存した。

標準アミノ酸は和工純薬工業KKと味の素KK製，メタノール，n-ブタノール，ジクロルメタン，クロロホルム，無水トリフルオロ酢酸およびトリクロル酢酸は和光純薬製のものを用いた。

血清FAAの分離精製

シロサケについては前報[24] の通りであるが，サクラマスについては更に微量化を行った。その概略は以下の通りである。血清 100μl に対し 10μl の内部標準液 (2.50μ moles ノルロイシン/ml, 0.1N) 塩酸) を正確に加え 0.5ml の 6% トリクロル酢酸を加えて撹拌後遠心分離を行い上澄を集めた。沈澱した蛋白質は 0.6ml の 5% トリクロル酢酸で洗浄してその洗液を合せ，稀アルカリで pH を中性とし，Dowex 50 X-8 (H^+, 100～200 mesh, φ10×10 mm) カラムに流下吸着させた。水洗後 N-アンモニアでアミノ酸を溶出し，50°C で減圧乾固しアンモニア臭の残るときは再度蒸溜水に溶解したうえ減圧乾固した。アミノ酸の混合物は容器の底に無色透明の膜状に得られる。

アミノ酸のガスクロマトグラフィー

試薬の蒸溜および機器の測定条件は Gehrke らの方法[25] を多少モディファイした前報[24] の通りである。アミノ酸の誘導体の調製については シロサケの場合は 前報[24] に従い，サクラマスの場合は Roach らの方法[26] に準じ操作の簡略化をはかった。すなわち，アミノ酸のうち塩基性のものは n-ブタノールに対する溶解性が低いが塩酸濃度を 3 規定にあげて超音波をかけることにより溶解させうる。乾燥アミノ酸試料 (50～100γg) に 3 ml の n-ブタノール (乾燥3N-塩酸を含む) を加え超音波を 60 秒間照射し溶解したうえ 100°C，10分間エステル化反応を行った。反応液を 50°C で減圧乾固してアミノ酸の n-ブチルエステル混合物をえた。これにジクロルメタン 300μl と無水トリフルオロ酢酸 100μl を加え超音波を 15 秒間照射し溶解，アンプル中 150°C 5分間加熱することによりトリフルオロアセチル化を行った。冷却後 5～10μl を分析に供した。

実 験 結 果

血清 FAA の分析

生体成分としての FAA の抽出分離法は必ずしも厳密に確立されているわけではない。こゝでは 5% のトリクロル酢酸に溶け，共存する有機酸，糖，ヌクレオチドおよびアミンをイオン交換樹脂で除去したものを FAA としたが，この操作では低分子のペプチドの混在はまぬがれない。イオン交換樹脂の利用には前述の外にも Dowex 50 X-8(H^+) を酸性の状態で使用するものと，前述の方法に引きつゞき Dowex 1 X-8(OH^-) を用いる方法を検討したが，前者は酸性アミノ酸後者は塩基性アミノ酸の損失を来し精製効果は得られなかった。血清 FAA については強酸性イオン交換樹脂 (H^+) を中性の状態で使用するだけで精製の目的はおゝむね達成される。

EGSS-DEGS カラムを用いてのガスクロマトグラフィーはアルギニン，ヒスチジン，シスチン等の分析に問題を残したが[24]，現在では当研究室においても OV-17(Phenylmethylsiloxane) カラムでほぼ解決されることが確められている。今回サクラマスについてもシロサケで行った15種類のアミノ

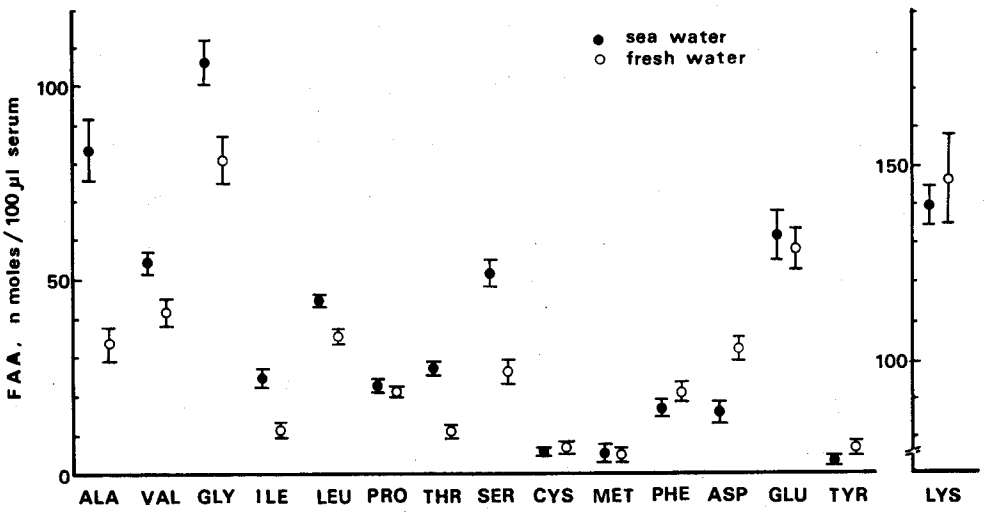

Fig. 2. The averages and standard deviations of the serum free amino acids of the chum salmon from sea water and from fresh water.

酸を分析したのでこゝでは OV-17 は使用しなかった。EGSS-DEGS カラムによるシロサケのクロマトグラムには未確認ピークがみられ，アスパラギン酸とグルタミン酸の間に溶出されて来る2つのピークとチロシンとリジンの間に溶出されて来る1つのピークはシロサケの卵の FAA クロマトグラム[24]にみられる U_1, U_2 および U_3 に相当しており，うち U_3 はオルニチンと同定された。

シロサケ FAA

各グループの FAA は各々個体別に測定しその平均値および標準偏差を図 2 に示した。有意差の検定は Mann-Whitney の U-テスト[27]により，中央値および U- 統計量を表 1 に示した。5% の有意水準で2中央値の差の検定を行うと $n_1=n_2=4$ の場合 U_1 あるいは U_2 が 0, $n_1=n_2=8$ の場合 U_1 あるいは U_2 が 13 またはそれ以下でなければならない。前者は性差の検定に後者は海水域と淡水域の差の検定に用いた各グループの個体数である。検定の結果9種類のアミノ酸に有意差が認められ，アラニン，スレオニン，セリン，イソロイシン，バリン，グリシン，ロイシンの7種類のアミノ酸が海水域で高濃度，アスパラギン酸，フェニルアラニンは淡水域で高濃度であることが判明した。なかでもアラニンは $U_1=0$ ($n_1=n_2=8$) で海水域のすべての個体が淡水域のどの個体よりも高い値を示した。システイン，メチオニン，チロシンは含有量も少く有意差は認められなかった。グルタミン酸は比較的高濃度，リジンは極めて高濃度であるが共に有意差は認められなかった。尚，リジンの位置に酸加水分解により消失する末確認物質の溶出が観察されたので，リジンの値は 6 規定塩酸 110°C 24時間加水分解後の値に補正されている。性差は海水域では全くみられず，淡水域では3種類のアミノ酸: グリシン(♀≫♂)，セリン (♀≪♂)，プロリン (♀<♂) にみられ，U_1 あるいは U_2 が 0 を示した。また，FAA全量の平均値は海水域で 670.1 n moles/100 µl，淡水域で 547.8 n moles/100µl であった。この値は15種類のアミノ酸含量の合計として与えられたものである。

Tabel 1. *The U-test parameters and the medians of the serum free amino acids of the chum salmon from sea water and from fresh water.*

	Median*		Parameter	
	sea water	fresh water	U_1	U_2
Alanine	85.9	33.1	0	64
Valine	50.4	44.4	8.5	55.5
Glycine	104.6	76.6	12	52
Isoleucine	27.8	13.3	5	59
Leucine	45.7	39.6	13	51
Proline	24.8	21.3	27	37
Threonine	29.0	10.1	1	63
Serine	57.1	26.2	3	61
Cysteine	7.1	6.7	31.5	32.5
Methionine	3.0	7.7	40.5	23.5
Phenylalanine	17.0	21.8	51	13
Aspartic acid	20.4	35.2	57.5	6.5
Gultamic acid	58.3	57.0	27	37
Tyrosine	4.7	7.7	40.5	23.5
Lysine	139.2	153.0	37	22
Total	675.0	553.7		

*n moles/100 μl serum

サクラマスの FAA

サクラマスは本実験のために用意したものではなく，養魚場から分与されたものであり海水槽3尾淡水池4尾の合計7尾の雌魚で，この個体数では有意差検定ができなかった。また実験条件としては，サクラマスの場合は淡水から海水に移されシロサケの遡上と逆方向であること，海水に移されたものは3ケ月経過していること，淡水池海水槽共に充分飼料が与えられていることがシロサケの場合との大きな相違点となる。一応淡水池と海水槽の比較は図3に示した。アラニン，バリン，グリシンなどが比較的高濃度であった。また FAA 全量の平均値は血清 100 μl 当り淡水池で 492.7 n moles，海水槽で 482.6 n moles と大差なく且つシロサケに比べ低い値を示した。

考　　察

種々のクロマトグラフィーが改良されアミノ酸が比較的容易に且つ正確に定量されるようになって食品蛋白質のアミノ酸組成や特に水産物についてはエキス成分と云うカテゴリーでその成果の多くが示されたが，生体組織や体液の FAAについての報告は少ない。その理由の一つとしてこれらの FAA が低濃度（例えばイヌの血漿中の FAA 全量が 4.4～4.8mg/100ml[28]）であることが挙げられる。殊に魚類については個体別に相当量の血清を集めることが困難であるが，ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸の定量はその微量化と簡便さにおいてこれらの問題に応えたと云えよう。

浸透圧と FAA プール又は特定のアミノ酸濃度との関係についての検討が海産無脊椎動物[4-11]で行われているが，このうち特に特定アミノ酸とその生物の生棲環境海水塩濃度との間に正の相関々係の存在を示した報告は重要と考える。生体内の浸透圧保持のため溶質となる物質は選択されており，この選択は物質の電子配位や化学構造などによる膜透過性の問題とも関連することが考えられる[31,32]。

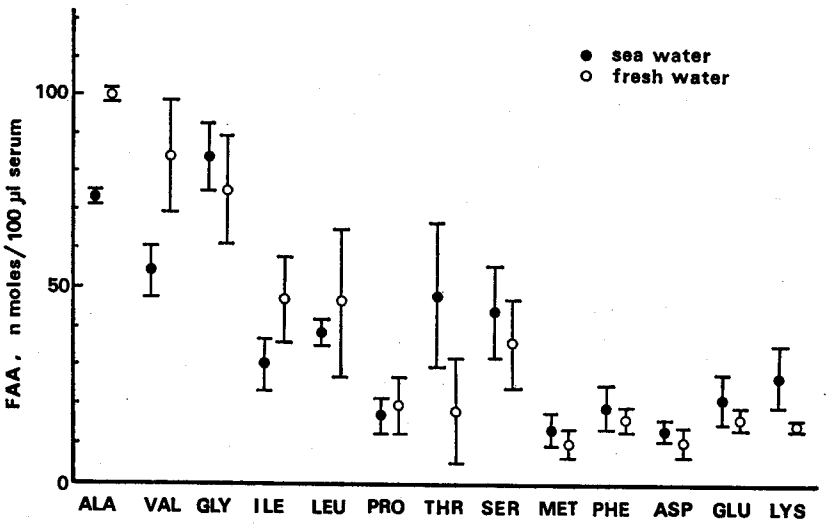

Fig. 3. The averages and standard deviations of the serum free amino acids of cherry salmon from a sea water cistern and from fresh water.

して無脊椎動物ではタウリンとアラニンが指摘されている。エボシガイでは FAA 全量が季節変動しその濃度は秋に高く春に低い[11]。エボシガイを10月から12月まで絶食させると FAA 濃度が上昇し特にアラニンが顕著である。

魚類の血清 FAA についての最近の報告として Mehrle ら[30] はニジマスを 0, 6, 24時間強制的に游泳させ FAA 濃度の変化を観察したものがある。種々のアミノ酸が減少するのに反し，アラニンとアルギニンの 0→24時間での顕著な増加とグルタミン酸の 6→24 時間での増加が認められている。本実験のシロサケも実験条件として海水域淡水域共に絶食下である点ニジマスの場合と変らない。サケ血清の FAA 全量はブタの 2～3 倍であるとの報告があるが[29]，シロサケ，サクラマス共に高い値を示し前述のイヌの血漿 FFA 全量のおよそ 15～20倍となりこの値は Mehrle らのニジマスの値とよく一致する。尚，計算された値はニジマスが 716.7 n moles/100 µl でシロサケ，サクラマスより高いが，これは本実験では 15 種類のアミノ酸の測定から求めた値であるため真の FAA 全量より低い値を示しているからである。また，シロサケがサクラマスに比べて高い FAA 全量を示すが，この差はリジン含量の極端な違いから生じている。シロサケにみられる高濃度のリジンは筋肉蛋白のカタボリズムにより供給されるのであろう。そして，比較的高い濃度を示すグルタミン酸，グリシン，アラニン，セリンは特に生合成され易いアミノ酸であると考えられる[1,5]。性腺の成熟はディスク電気泳動による血清蛋白の比較[23]から卵形成に向うリポビテリンが海水域の雌に多くみられることから，淡水域は完熟海水域は完熟に近い状態と判断された。しかし，血清 FAA 含量の性差は淡水域の雌雄についてだけみられ，その 3 種類のアミノ酸，グリシン，セリン，プロリンについては性腺の熟度等に関連して説明することはむづかしい。

シロサケの場合，海水域と淡水域との間で環境および生理的条件——環境水塩濃度，環境水温，運動量，窒素の排泄量等に若干の差異があるものと考えられる。図 2 にみられる海水域と淡水域との差はこれらの条件の違いにより，或は違いに対応して，生じる FAA の変化の総和であるが，海水域で高く淡水域で低いアミノ酸は条件の中で最も違いの大きい環境水塩濃度と関係するのではなかろうか。

これは魚類においても海産無脊椎動物にみられる特定アミノ酸の浸透圧調節への関与の可能性が示唆されていると思われる。

魚類のFAA濃度と環境水温との関係を扱った報告は見当らないが，Mester ら[33]がドジョウ筋肉中のトランスアミナーゼの性質を温度適応の見地から動力学的解析を行い二つのイソ酵素の一方が“適応酵素は適応温度においてその基質に対し最大親和性を示し”いま一つは之に従わないことを見いだし，この酵素は基質（アラニン）濃度によりよく調節されていることを報告している。この酵素は動植物，微生物に広く分布するものでシロサケにおいても環境水温に適応するための FAA 濃度変化の調節に一つの役割を演じていることが考えられる。

運動量について考えると，より多くのエネルギーを消費するであろう海水域においてアラニン，スレオニン，セリンの濃度が高い。これらのアミノ酸は筋肉蛋白の分解により生じる余剰のアミノ基のキャリヤとして機能しているのではなかろうか。また必須アミノ酸の分岐鎖アミノ酸が高い濃度を示すことについては絶食状態では筋肉蛋白の分解を唯一の供給源と考えなければならない。その他システイン，メチオニン，チロシンの濃度は低く，Herbert[16] が指摘したようにこれらのアミノ酸の代謝速度が遅く，一般に組織や体液中の濃度も低いとの考えが魚類においてもあてはまるのであろうか。フェニルアラニンについては哺乳動物血液中のこのアミノ酸だけの定量法を Mehrle DeClue[30] が魚類に応用して血清 100 ml 当り 4.9±0.5 mg であると報告しており，本実験のシロサケは海水域で 2.9±0.3 mg，淡水域で 3.5±0.4 mg，またサクラマスでは海水槽で 3.1±1.0 mg 淡水池で 2.6±0.5 mg であった。シロサケで海水域に比べ淡水域でやゝ高い値を示したがこれはブナ化に伴う表皮色素の変化と関連するのかもしれない。しかし，アスパラギン酸が海水域で低く淡水域で高い濃度を示すことについての説明はむづかしい。

哺乳動物について，石川の報告[1]によると糖新生の盛んになる最も簡単な条件は絶食であり，絶食ラットの肝臓と腎臓（糖新生の場）を摘出すると血中 FAA 中にアラニン，リジン，グルタミン，グリシン，プロリンの増加がみられる。そして筋肉蛋白の分解から考えられる分岐鎖アミノ酸の増加はみられない。これは組織で代謝されその窒素がアラニン，グルタミンの窒素に転換されて血中に放出され，アラニン，グルタミン或はセリンが臓器管を流動するアミノ酸代謝の最終産物であり，窒素運搬体であると考えた。そして，特にどの組織からも放出されるアラニンがアミノ酸の中で最も有効な肝糖新生の素材となりうること[32,34]，糖新生を促進するグルカゴンの分泌がアラニンにより促進される[35]，解糖系のピルビン酸キナーゼがアラニンにより阻害され，絶食ラット肝でセリン脱水素酵素やオルニチントランスアミナーゼなどがアラニン投与により誘導されるなどの点が指摘されている。

海産無脊椎動物でまた哺乳動物でアラニンが特に生合成されやすくまた生理機能の調節に登場しやすいことが確かめられつゝある時に，魚類においてもシロサケのライフサイクルを利用した絶食下，環境条件の異る試料個体群の血清 FAA 分析の比較により多数のアミノ酸で有意差が認められ，特にアラニンが顕著な差を示すことがわかった。アラニンの生産は余剰のアミノ基とピルビン酸の存在で充分行われ，長い進化に耐え無脊椎動物から哺乳動物に至る幅広い生物層でアミノ酸代謝の要として存在し，nitrogen carrier を主とする機能とこれに併せて intracellular osmotic regulation 等の機能を果していると考えられよう。

今後，サクラマス等飼育可能である魚種につきその供試個体数を多くすると共に比較実験の条件設定を充分に行うことがこの方面の研究発展に必要であり，この他アルギニン，クレアチン，タウリンの分析が重要であると考えられる。更に，魚類の血清 FAA の値そのものの標準的データーの集積がその生理状態と環境の変化に対する適応情況の判断に必要と考える。哺乳動物についても FAA やその中のアラニンの生体内で果す役割についてエネルギー獲得系を示唆するもの[36,37]が最近になってやっと報告されるようになったばかりである。将来，魚類におけるこの方面の研究は水産化学の基礎

となり更に生化学の発展に寄与すると信じる。

文　　献

1) 石川栄治 (1972). 高等動物におけるアミノ酸代謝の全体像 —高等動物のアミノ酸代謝をどのように捉えるか—. 生物と化学 **10**,(12), 831–837.
2) S. J. パッハ (1955). 高等動物のアミノ酸代謝—高等動の蛋白質構成成分の代謝—田宮信雄・近藤洋一・亀山忠典 共訳 文光堂, 東京.
3) 近藤金助 (1960). アミノ酸の栄養・生化学 産業図書株式会社, 東京.
4) Camien, M.N., Sarlet, H., Dijchâteau, Gh. and Florkin, M. (1951). Nonprotein amino acids in muscle and blood of marine and fresh-water Crustacea. *J. Biol. Chem.* **193**, 881–885.
5) Lewis, P.R. (1952). The free amino acids of invertebrate nerve. *Biochem. J.* **52**, 330–338.
6) Allen, K. and Awapara, J. (1960). Metabolism of sulfur amino acids in *Mytilus edulis* and *Rangia cuneata*. *Biol. Bull., Woods Hole* **118**, 173–182.
7) Lange, R. (1963). The osmotic function of amino acids and taurine in the mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **10**, 173–179.
8) Lynch, M.P. and Wood, L. (1966). Effects of environmental salinity on free amino acids of *Crassostrea virginica* Gmelin. *Ibid.* **19**, 783–790.
9) Virkar, R.A. and Webb, K.L. (1970). Free amino acid composition of the soft-shell clam *Mya arenaria* in relation to salinity of the medium. *Ibid.* **32**, 775–783.
10) DuPaul, W.D. and Webb, K.L. (1970). The effect of temperature on salinity-induced changes in the free amino acid pool of *Mya arenaria*. *Ibid.* **32**, 785–801.
11) Cook, P.A., Gabbott, P.A. and Youngson, A. (1972). Seasonal changes in the free amino acid composition of the adult barnacle, *Balanus balanoides*. *Ibid.* **42B**, 409–421.
12) Coulson, R.A. and Hernandez, T. (1965). Amino acid metabolism in the alligator. *Fed. Proc. Symp.* **24**, 927–940.
13) Coulson, R.A. et al. (1967). Changes in free amino acids of caymans after feeding. *Am. J. Physiol.* **212**, 1308–1312.
14) Coulson, R.A. et al. (1967). Site of synthesis of amino acids in the intact cayman. *Ibid.* **213**, 411–417.
15) Coulson, R.A. et al. (1968). Amino Acid metabolism in chameleons. *Comp. Biochem. Physiol.* **25**, 861–872.
16) Herbert, J.D. and Coulson, R.A. (1972). Amino acid metabolism in chameleon liver. *Ibid.* **42B**, 463–473.
17) Creach, Y. et Serfaty, A. (1964). Les acides aminés libres du sang de Carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *C.R. Séanc. Soc. Biol.* **158**, 1152–1156.
18) Pequin, L. et Serfaty, A. (1966). Acide glutamique et excrétion azotée chez la Carpe commune, *Cyprinus carpio* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 141–149.
19) Cowey, C.B. and Daisley, K.W. (1962). Study of amino acids, free or as components of protein, and of some B vitamins in the tissues of the atlantic salmon, Salmo salar, during spawning migration. *Ibid.* **7**, 29–38.
20) Cowey, C.B. (1963). The non-protein nitrogenous constituents of the muscle of parr and smolt stages of the atlantic salmon (*Salmo salar*). *Ibid.* **8**, 47–51.
21) Wilson, R.P. and Poe, W.E. (1974). Nitrogen metabolism in channel catfish, *Ictalurus punctatus* — III. Relative pool sizes of free amino acids and related compounds in various tissues of the catfish. *Ibid.* **48B**, 545–556.
22) Mehrle, P.M., Stalling, D.L. and Bloomfield, R.A. (1971). Serum amino acids in

rainbow trout (*Salmo gairnderi*) as affected by DDT and Dieldrin. *Ibid.* 38B, 373–377.

23) 米田勤・石原義雄(1974). シロザケ(Oncorhynchus keta) およびサクラマス (Oncorhynchus masou) の血清蛋白ディスク電気泳動像. 北大水産彙報 **24**, (2), 76–89.

24) 国崎直道・米田勤・石原義雄 (1969). ガスクロマトグラフィーによるアミノ酸定量分析について. 同誌 **20**,(3), 193–201.

25) Gehrke, C.W., Zumwalt, R.W. and Wall, L.L. (1968). Gas-liquid chromatography of protein amino acids. *J. Chromatog.* **37**, 398–413.

26) Roach, D. and Gehrke, C.W. (1969). Direct esterification of the protein amino acids gas-liquid chromatography of N-TFA n-Butyl esters. *Ibid.* **44**, 269–278.

27) R.C. キャンベル(1967). 生物系のための統計学入門 石居進訳 p. 43, 培風館, 東京.

28) Harrow, B. and Mazur, A. (1958). *Textbook of Biochemistry* p. 178, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

29) Chance, R.E. (1962). Ph. D. Dissertation, Purdue University, Lafayette, IN.

30) Mehrle, P.M. and DeClue, M.E. (1973). Phenylalanine determination in fish serum: adaptation of a Mammalian method to fish. *Anal. Biochem.* **52**, 660–661.

31) Ross, B.D., Hems, R. and Krebs, H.A. (1967). The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem. J.* **102**, 942–951.

32) Aikawa, H., Matsutaka, H., Takezawa, K. and Ishikawa, E. (1972). Gluconeogenesis and amino acid metabolism — I. Comparison of various precursors for hepatic gluconeogenesis *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 234–244.

33) Mester, R., Iordachescu, D. and Niculescu, S. (1973). The influence of adaptation temperature on the behaviour of L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase of the skeletal muscle of pond loach (*Misgurnus fossilis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **45B**, 923–931.

34) Ishikawa, E., Aikawa, T. and Matsutaka, H. (1972). The role of alanine and serine in hepatic gluconeogenesis. *J. Biochem.* **71**, 1093–1095.

35) 野中共平, 吉田隆司・垂井清一郎(1972). 日内泌誌 **47**, 969.

36) Odessey, R., Khairallah, E.A. and Goldberg, A.L. (1974). Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. J. Biol. Chem. **249**, (23), 7623–7629.

37) Owen, T.G. and Hochachka, P.W. (1974). Purification and properties of dolphin muscle aspartate and alanine transaminases and their possible roles in the energy metabolism of diving mammals. *Biochem. J.* **143**, 541–553.