



Title	ウマ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸分析
Author(s)	高沢, 俊英; TAKASAWA, Toshihide; 塩川, 洋之 他
Description	
Citation	結核の研究, 34, 31-37
Issue Date	1974-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26832
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_P31-37.pdf



ウマ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸分析

高沢 俊英 塩川 洋之

北海道大学結核研究所生化学部

(昭和48年9月25日受付)

クレアチンキナーゼのアミノ酸分析については、最初、Kuby らによりウサギ骨格筋から結晶として単離¹⁾されて以来、古くは Friedberg²⁾ 最近では Kaplan ら³⁾ により部分分析の結果が報告されているが、完全分析は、Kuby ら⁴⁾ による結果が報告されているのみである。

今回、クレアチンキナーゼをウマ骨格筋から結晶として単離し、そのアミノ酸分析を行なったのでその結果を報告する。

加水分解方法としては、従来古くから用いられてきた定沸点 6N HCl による酸加水分解方法が一般的でかつ信頼性が高いが、この加水分解方法では、tryptophane, total halfcystine の定量性に問題点がある。

トリプトファン残基についてはそのインドール核のもつ特殊性のために他の残基とは異なった性格を有し、それが酸化的状態でも不安定な残基であるために、普通、アミノ酸分析に用いる 6N HCl, 110°C^{5,6)} という加水分解条件では、多くの場合加水分解中にほぼ完全に破壊されてしまうので定量は困難である。そのような理由からトリプトファンの定量法がいろいろ開発検討されてきたが⁷⁻¹⁸⁾、これまで広く用いられてきた個別定量方法にはかなりの誤差がある場合が少なくなく信頼性の点で問題があった。

しかし近年開発された、Matsubara ら¹⁹⁾ のチオグリコール酸を用いる 6N HCl 加水分解方法並びに T. Y. Liu, Y. H. Chang ら^{20,21)} により開発検討された 0.2% 3-(2-aminoethyl)-indole を用いる 3N p-トルエンスルホン酸加水分解方法は信頼度の点での進歩と合わせて、その他すべてのアミノ酸残基がほぼ正確に定量できるという利点がある。此の報告ではトリプトファンの回収率の点から T. Y. Liu, Y. H. Chang らの 3N p-トルエンスルホン酸加水分解方法を行なった。更に Goodwin らの紫外外部吸収測定法による定量も行なった。

次に、total halfcystine 分析についても、やはり不安定で加水分解中にかなり破壊されるという事実が報告されており⁵⁾、普通には、酸加水分解に先だてて S-カルボキシメチル化²²⁾ するか、あるいは過ギ酸酸化によりシステイン酸に変換し^{23,24)}、その後加水分解により定量する

方法が用いられてきたが、此の報告では、近年やはり T. Y. Liu, A. S. Inglis ら^{25,26)} により報告された、テトラシオン酸ナトリウムを用いる 6N HCl 加水分解法を行ない、その後還元、S-スルホ化し S-スルホシステインとして定量した。この方法の利点は加水分解前に化学修飾を行なう必要がなく、加水分解物を用いて定量出来る点にある。

此の報告では、この3通りの方法によって加水分解を行ないアミノ酸全分析を行なった。又同時に各々の方法の比較検討も行なった。そして最後にウサギ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸組成⁴⁾ との比較検討をした。

実験材料および方法

ウマ骨格筋クレアチンキナーゼはカラムクロマトグラフィにより最終的に精製し、結晶化により単離したものを2回蒸留水に対して低温室で約4日間透析を続け、透析外液は約8時間毎に交換した。透析した酵素液は、凍結乾燥し更にエタノール:エーテル、エーテルの順で洗い、真空デシケーター中で乾燥しエーテルを除いた後、110°C、減圧下で乾燥したものをそれぞれ加水分解に用いた。

6N HCl 加水分解法

蛋白質約 6 mg をバイレックス製肉厚試験管に正確に秤り取り、3回再蒸留定沸点 6N HCl 3 ml を加える。減圧下 (80~100 μ) で、ドライアイス-エタノールにより、冷却凍結・溶解を繰り返し塩酸中の溶存酸素を除いた状態で、減圧下において封管し加熱炉で 110°C で 22 時間、48 時間、72 時間、加水分解を行なった。加水分解物は、ロータリーエバポレーターにより蒸発乾固し、塩酸を除いた後 0.2N クエン酸緩衝液 pH 2.2 に溶かし、不溶性物質が生じた場合はこれを除いた後、0.6 mg 蛋白質相当量をカラムにかけアミノ酸分析を行なった。

テトラシオン酸ナトリウムを用いる 6N HCl 加水分解法

乾燥蛋白質約 13 mg を正確に秤り取り、それに蛋白質に含まれるトリプトファンのモル数の約 2 倍過剰量に相当する 1 mg のテトラシオン酸ナトリウムを加え、定沸点 6N HCl 6 ml を加え、6N HCl 加水分解方法の場合と

同じように加水分解を行なった。加水分解物をロータリーエバポレーターにより蒸発乾固し塩酸を除き、4.5 ml 蒸留水に溶かし、一部分はS-スルホシステニン化反応に先だててアミノ酸分析を行ない、S-スルホシステニン化反応は1 ml を使い、A. S. Inglis らの方法によって、ジチオスレイトールでシステニンに還元し、ひき続いてテトラシオン酸を加え、S-スルホ化反応を行なった。

0.2% 3-(2-aminoethyl)-indole を用いた 3N p-トルエンスルホン酸加水分解法

乾燥蛋白質約5 mg を加え、最後に3N p-トルエンスルホン酸2 ml を加え、減圧下(30 μ) 110°C で、22時間、48時間、72時間、加水分解した。加水分解後、等容の2N NaOH を加えそのまま蛋白質0.6 mg 相当の量を直接アミノ酸分析器で分析した。

アミノ酸分析法

アミノ酸分析は、日立アミノ酸自動分析器 (Model KLA-3B) を使用、塩基性アミノ酸分析はφ9×70 mm カラム (日立球状樹脂 #2611) を用い、0.35N クエン酸緩衝液 pH 5.28 による一段階溶出で、中酸性アミノ酸分析は、φ9×500 mm カラム (日立球状樹脂 #2612) を用い、0.2N クエン酸緩衝液 pH 3.25 および pH 4.25 の2段切り換え温度55°C で溶出を行なった。

トリプトファンの個別定量法

乾燥蛋白質5 mg を N/10 NaOH 10 ml に溶かし、室温で1日放置後、Goodwin らの紫外外部吸収測定法により定量した^{9,11~13}。

ケルダール-ニンヒドリン法によるアミド態窒素の定量法^{27,28}

容量25 ml のナシ型フラスコに乾燥蛋白質8~10 mg を正確に秤量し、2N HCl 2.0 ml およびオクタノール数滴を加え、還流冷却器をつけて3時間ゆるやかに沸騰させた後²⁹、氷水で冷却しメチルレッド指示薬1~2滴を加え、メチルレッドの変色点直前まで5N および1N NaOH で中和した。この溶液をケルダールの蒸留装置に定量的に流し込み、ホウ酸緩衝液5 ml およびオクタノール数滴を加えて1分半蒸留し、蒸留後受器内の溶液を0.2N クエン酸緩衝液 pH 5.0 でメスフラスコを用いて25 ml にうすめ、その1 ml をとってニンヒドリン呈色を行なった。アンモニアのニンヒドリン呈色用標準曲線は、硫酸アンモニウムを用いて試料と同時に呈色反応を行なった。ニンヒドリン呈色反応は、Yem, Cocking らの方法³⁰ を用いて行なった。

実験結果

酸加水分解は、22時間、48時間、72時間の3点の加

表1 6N HCl 加水分解物アミノ酸組成*

アミノ酸	22 時間 加水分解物	48 時間 加水分解物	72 時間 加水分解物	平均値又は 補外値
Trp				0.096**
Lys	0.805	0.806	0.802	0.804
His	0.375	0.379	0.367	0.373
NH ₃	0.694	0.777	0.835	0.640
Arg	0.425	0.422	0.408	0.418
Asp	1.077	1.044	1.050	1.057
Thr	0.374	0.344	0.327	0.395
Ser	0.460	0.382	0.340	0.510
Glu	1.041	1.016	1.019	1.025
Pro	0.466	0.468	0.475	0.470
Gly	0.808	0.805	0.804	0.805
Ala	0.365	0.370	0.370	0.368
Cys				
Val	0.669	0.695	0.704	0.704
Met	0.235	0.236	0.229	0.234
Ileu	0.312	0.329	0.337	0.337
Leu	0.846	0.838	0.847	0.844
Tyr	0.234	0.233	0.237	0.234
Phe	0.397	0.402	0.401	0.400

* 数値は蛋白質1 mg 当りの μmole 数で示してある。

** Goodwin らの紫外外部吸収測定法により求めた。

水分解時間で行なった。

表1は、6N HCl 加水分解物から回収されたアミノ酸分析値をそれぞれの加水分解時間について示した。(最後の欄は平均値又は補外値を示した)

各アミノ酸残基についての加水分解時間に対する変化は、1) セリン、スレオニンの破壊は誤差内で時間とともにほぼ一次反応速度論的に直線的に起っていると考えられる(図1)。加水分解72時間後には、セリンは約25%が、スレオニンは約12%程度破壊されてしまっている。

Hirs らは³¹、110°C ではセリン、スレオニンを含むアミノ酸混合液中では、その破壊が一次反応速度論的に起っている事を見出し、リボヌクレアーゼのアミノ酸組成分析に際し、セリン、スレオニンについて片対数補外法を採用したが、此の報告でも片対数補外法を両アミノ酸残基に対して行なって0時補外値を求めたが、先に求めた0時補外値と誤差内でほとんど一致した結果が得られた。

一方、Kassel らは³²、キモトリプシノーゲンについての実験結果で、セリン、スレオニンの破壊は二次反応速度論的に起っているとして計算しているが、この場合にもやはり一次反応速度論的に破壊が起っているという可

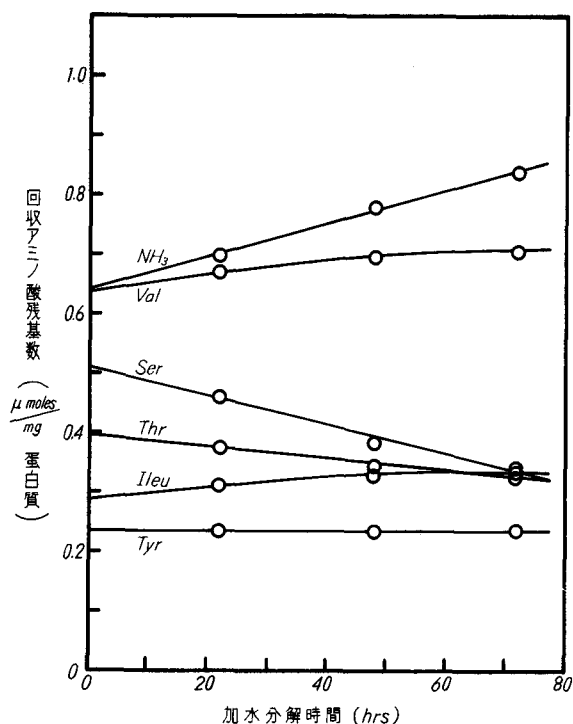


図1 加水分解時間とアミノ酸残基回収率の関係
(6N塩酸加水分解法)

能性は除外できないと思われる。

クレアチンキナーゼの場合、実験結果ではセリン、スレオニンの破壊は、加水分解時間とともに直線的に起り、回収率が減少しているものと考えた方が良いと思われる(図1)。

2) バリン、イソロイシンについては、そのペプチド結合は加水分解に対する抵抗性が強く³³⁾。その回収率が加水分解時間とともに双曲線的に増加するといわれているが、結果からは、加水分解時間による回収率の変化は余り顕著でなく、22時間加水分解でもほとんど加水分解されている様である。此の報告では回収率が最大のものを補外値とした。

3) その他のアミノ酸残基については、72時間加水分解後に於ても安定で破壊はほとんど起っていないと思われる。

加水分解中に酸素が存在すると不安定であると思われるチロシンについてもほとんど時間に対して安定で、破壊は起っていないようである(図1)。

又この酸加水分解結果からアミド態アンモニアを0時補外法により求めると、その補外値は蛋白質1mg当り0.64 μmoleのアミド態アンモニアとなる(図1)。

表2 6N HCl (+Na₂S₄O₆) 加水分解物
アミノ酸組成*

アミノ酸	22時間加水分解物	48時間加水分解物	72時間加水分解物	平均値又は補外値
Trp				
Lys	0.718	0.720	0.750	0.730
His	0.342	0.344	0.352	0.346
NH ₃	0.655	0.715	0.801	0.578
Arg	0.371	0.379	0.389	0.380
Asp	1.072	1.090	1.090	1.084
Thr	0.380	0.365	0.341	0.408
Ser	0.506	0.407	0.357	0.563
Glu	1.031	1.050	1.040	1.040
Pro	0.471	0.497	0.500	0.489
Gly	0.852	0.850	0.823	0.842
Ala	0.393	0.390	0.378	0.387
Cys**	0.092	0.082	0.078	0.103
Val	0.680	0.699	0.697	0.699
Met	0.230	0.210	0.215	0.218
Ileu	0.321	0.336	0.335	0.336
Leu	0.872	0.854	0.858	0.861
Tyr	0.247	0.235	0.230	0.259
Phe	0.412	0.412	0.397	0.407

* 数値は蛋白質1mg当りの μmole 数で示してある。

** S-スルホホスチンとして定量。

ケルダール-ニンヒドリン法^{27,28)}によりアミド態アンモニアを個別定量した場合には、蛋白質1mg当り0.63 μmoleのアミド態アンモニアが定量され、カラムクロマトグラフィーから求められたものと誤差内で良く合致している。

表2は、total halfcystine を定量するために、テトラシオン酸ナトリウムを用いて6N HCl加水分解^{25,26)}を行なった結果をまとめたものである。クレアチンキナーゼにはトリプトファン残基が含まれており、これが加水分解により新たに生じたスルフヒドリル基と相互作用し、その結果としてシステインの破壊が起るといふ事から、加水分解中、スルフヒドリル基を保護するために試料に含まれるトリプトファンの約2倍モル過剰量のテトラシオン酸ナトリウムを添加して加水分解を行なった。

加水分解時間に対する回収されたアミノ酸残基量の主なものは、図2に示されるように、6N HCl加水分解法の結果と同様な傾向を示している。表2に於て、6N HCl加水分解法(表1)と比較すると、塩基性アミノ酸であるリジン、アルギニンは回収率が低く、逆に中酸性アミノ酸であるセリン、グリシンについては回収率が高いとい

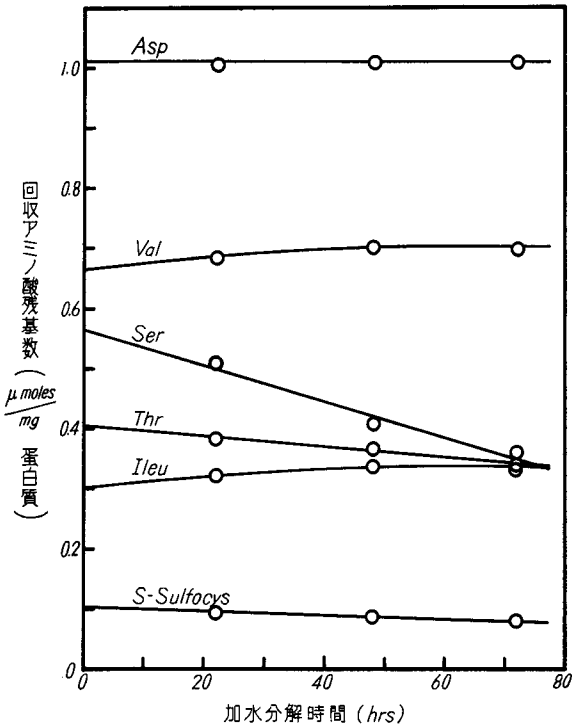


図2 加水分解時間とアミノ酸残基回収率の関係 (Na₂S₄O₆ を用いる 6N 塩酸加水分解法)

う結果になっている。その他のアミノ酸残基については、ほぼ実験誤差内で 6N HCl 加水分解法の結果と合致している。

total halfcystine の定量は、酸加水分解物を S-スルホシスチン化反応した後、S-スルホシスチンとして定量し、内部標準としてアスパラギン酸残基の数値を用いて換算した。内部標準としてアスパラギン酸を用い、シスチンとシスチンの混合物で S-スルホ化により S-スルホシスチンとして定量した予備実験に於ては、その回収率は 100% であった。

S-スルホシスチンとして定量される total halfcystine は図 2 に示した様に、この条件では加水分解時間に対してほぼ安定と見なされるが、ごくわずかながら時間とともに回収率の減少傾向を示している。

S-スルホシスチンの 0 時補外法による補外値は、蛋白質 1 mg 当り 0.103 μmole と求まる。

表 3 は 0.2% 3-(2-aminoethyl)-indole を用いた 3N p-トルエンスルホン酸加水分解^{20,21)}の結果を示してある。

加水分解時間に対するアミノ酸残基の回収率は、6N HCl 加水分解法の場合と同様な傾向を示している(図 3)。

トリプトファン残基については、図 3 から明らかな

表 3 3N p-トルエンスルホン酸 (3-(2-aminoethyl)-indole) 加水分解物: アミノ酸組成*

アミノ酸	22 時間加水分解物	48 時間加水分解物	72 時間加水分解物	平均値又は補外値
Trp	0.078	0.080	0.076	0.088
Lys	0.818	0.788	0.811	0.805
His	0.387	0.369	0.364	0.373
NH ₃	0.709	0.730	0.794	0.658
Arg	0.436	0.420	0.431	0.429
Asp	1.057	1.065	1.063	1.061
Thr	0.387	0.366	0.359	0.403
Ser	0.485	0.442	0.412	0.520
Glu	1.026	0.985	0.996	1.002
Pro	0.457	0.461	0.444	0.454
Gly	0.793	0.834	0.823	0.816
Ala	0.362	0.381	0.367	0.370
Cys				
Val	0.567	0.667	0.668	0.668
Met	0.277	0.271	0.262	0.270
Ileu	0.286	0.307	0.325	0.325
Leu	0.853	0.826	0.831	0.836
Tyr	0.226	0.246	0.231	0.234
Phe	0.412	0.418	0.373	0.401

* 数値は蛋白質 1 mg 当りの μmole 数で示してある。

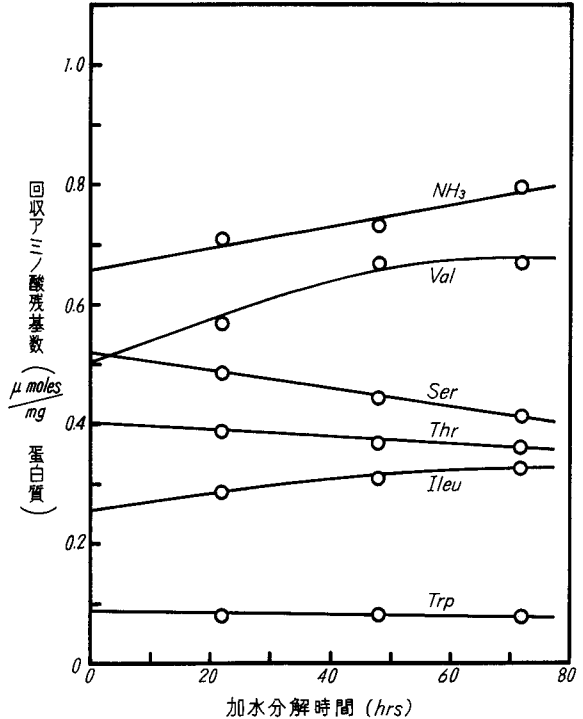


図 3 加水分解時間とアミノ酸残基回収率の関係 (3N p-トルエンスルホン酸加水分解法)

表4 3つの酸加水分解方法から得られたアミノ酸組成および
ウサギ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸組成⁴⁾*

アミノ酸	6N HCl 加水分解法	6N NHCl(+Na ₂ S ₄ O ₆) 加水分解法	3N p-トルエンスルホン酸加水分解法	ウサギ骨格筋 クレアチンキナーゼ
Trp	1.79		1.64	1.60
Lys	10.31	9.35	10.32	10.28
His	5.12	4.74	5.12	5.65
Arg	6.53	5.93	6.70	6.63
Asp	12.17	12.48	12.22	11.80
Thr	3.99	4.12	4.08	4.23
Ser	4.44	4.90	4.53	4.43
Glu	13.24	13.43	12.94	11.87
Pro	4.56	4.75	4.41	4.38
Gly	4.60	4.80	4.66	4.39
Ala	2.62	2.75	2.63	2.22
Val	6.98	6.93	6.63	6.49
Met	3.06	2.86	3.54	3.08
Ileu	3.82	3.81	3.68	3.54
Leu	9.55	9.75	9.46	9.77
Tyr	3.82	4.23	3.82	3.79
Phe	5.89	5.99	5.90	5.44
Amide ammonia:				
By chromatography	1.03	0.93	1.05	1.08
By Kjeldahl-Ninhydrin	1.01			
Total half-cystine		1.05		1.01

* 数値は蛋白質 100 g 当りのアミノ酸残基数 (g) で示してある。

様に 3N p-トルエンスルホン酸中では安定で 72 時間加水分解後でもほとんど破壊されず安定に存在している。トリプトファン残基の 0 時補外値を求めると、蛋白質 1 mg 当り 0.088 μ mole と求まる。

Goodwin らの紫外部吸収測定法^{9,11,12)}により求まるトリプトファン含量は、蛋白質 1 mg 当り 0.096 μ mole と求まる。これら二つの方法によって得られるトリプトファン含量は誤差内で良く合致した結果が得られた。

他のアミノ酸残基の回収率については、メチオシン残基の回収率が高くなっていることを除いて 6N HCl 加水分解から得られる結果とほぼ完全に合致していることがわかる。

表4は、3つの加水分解方法によって得られた結果と Kuby らによるウサギ骨格筋クレアチンキナーゼの結果をまとめたもので、蛋白質 100 g 当りのアミノ酸残基数 (g): 重量% で示したものである。

これら 3つの方法を比較検討してみると、6N HCl 加水分解法と 3N p-トルエンスルホン酸加水分解法の結果は良く合致しており、トリプトファン分析と同時に他のアミノ酸残基数が正確に定量出来ることが明らかで、

6N HCl 加水分解法と同様に信頼度が高いと思われる。

しかしテトラシオン酸ナトリウムを用いた 6N HCl 加水分解法からの結果は、3N p-トルエンスルホン酸加水分解法から得られた結果にくらべてかなり違いがあり、total halfcystine 以外のアミノ酸残基については信頼度が低いと言える。しかし total halfcystine 分析の点では、酸加水分解した後定量できるという点は操作が簡単で大きな利点であり、個別定量法としては有用であろうと思われる。

次にウサギ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸組成と比較してみると、両者には余り明らかな違いはなく、グルタミン酸含量の違いが他に比べて幾分か大きい程度である。

表5は、6N HCl 加水分解法の結果をもとにして偏比容を計算したものである³⁴⁾。これから求まる偏比容は、0.734 ml/g と求まる。蛋白質の偏比容としては普通の数値である。

total N については、窒素自動分析 (Dumas) により 16.8% (3 回平均値) と求まり、アミノ酸分析から total N が 16.6% で、窒素量にして、アミノ酸分析によって 99%

表5 アミノ酸組成から偏比容の計算

アミノ酸残基	蛋白質mg 当りの μmole 数	蛋白質 100g当 りのg数 (重量%)	\bar{v}^{**}	$\bar{v} \times$ 重量%
Trp	0.096	1.79	0.74	1.326
Lys	0.804	10.31	0.82	8.454
His	0.373	5.20	0.67	3.430
Arg	0.418	6.53	0.70	4.574
Asp	0.737	8.48	0.60	5.090
Asn*	0.320	3.65	0.62	2.264
Thr	0.395	3.99	0.70	2.796
Ser	0.510	4.44	0.63	2.798
Glu	0.715	9.33	0.66	6.156
Gln*	0.310	3.97	0.67	2.662
Pro	0.470	4.56	0.76	3.466
Gly	0.805	4.60	0.64	2.941
Ala	0.368	2.62	0.74	1.937
Total half-Cys	0.103	1.05	0.61	0.639
Val	0.704	6.98	0.86	6.003
Met	0.234	3.06	0.75	2.298
Ileu	0.337	3.82	0.90	3.436
Leu	0.844	9.55	0.90	8.591
Tyr	0.234	3.82	0.71	2.715
Phe	0.400	5.89	0.77	4.534
Total		103.64		76.110

* Asn, Gln の数値はアミド態アンモニアを Asp, Glu のモル比に配分したものである。

** アミノ酸残基の偏比容は Cohn, Edsall らのデータ³⁴⁾を引用した。

偏比容は次の様に計算される。

$$76.110/103.64=0.734 \text{ ml/g}$$

が回収された事を示している。

考 索

此の報告では3つの酸加水分解法を用いてウマ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸全分析を行ない、アミノ酸組成を決定したが、結果からも明らかな様に3N p-トルエンスルホン酸加水分解方法はトリプトファン定量分析と同時に他のアミノ酸残基の定量が可能で、6N HCl 加水分解方法と同様に信頼度が高く、6N HCl 加水分解方法に代わる方法として有用な方法である。しかしながらこの方法の操作上の大切な点は、加水分解時に於ける真空度に回収率が敏感なので、6N HCl 加水分解方法の場合より以上に真空度に注意を払わなければならない点である。とくにメチオニン残基については、到達真空度が低いと酸化され、メチオニンスルホキシドに変換する傾向がみられた。

テトラシオン酸ナトリウムを用いた6N HCl 加水分解方法は、total halfcystine 分析のためには有用であるが、全分析に応用するには難点がある様である。簡便には、22時間加水分解物についてのみでも、大体誤差内で許される回収率であると思われる。

結 論

3つの異なる酸加水分解方法によって、ウマ骨格筋から結晶として単離したクレアチンキナーゼのアミノ酸全分析を行ない、アミノ酸組成を決定した。ウサギ骨格筋クレアチンキナーゼのアミノ酸組成との比較では、両者に余り明らかな相違はなくグルタミン酸含量の違いが他のアミノ酸残基にくらべて幾分大きい程度であった。

参 考 文 献

- 1) S. A. Kuby, L. Noda and H. A. Lardy: J. Biol. Chem., **209**, 191 (1954).
- 2) F. Friedberg: Arch. Biochem. Biophys., **61**, 263 (1956).
- 3) H. M. Eppenberger, D. M. Dawson and N. O. Kaplan: J. Biol. Chem., **242**, 204 (1967).
- 4) E. A. Noltmann, T. A. Mahowald and S. A. Kuby: J. Biol. Chem., **237**, 1146 (1962).
- 5) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore: Anal. Biochem., **30**, 1190 (1958).
- 6) D. H. Spackman: Methods in Enzymology, **XI**, 3 (1967).
- 7) J. R. Spies and D. C. Chamber: Anal. Chem., **20**, 30 (1948).
- 8) J. R. Spies and D. C. Chamber: Anal. Chem., **21**, 1249 (1949).
- 9) 実験化学講座, **23**, 143, 丸善 (1957).
- 10) J. Leggett-Baily: Techniques of Protein Chemistry, 2nd Ed., Elsevier Pub. Co., Amsterdam, New York and London (1967).
- 11) T. W. Goodwin and R. A. Morton: Biochem. J., **40**, 628 (1946).
- 12) T. W. Goodwin and R. A. Morton: Biochem. J., **41**, 146 (1946).
- 13) G. H. Beaven and E. R. Holiday: Advances in Protein Chem., **7**, 320 (1952).
- 14) V. K. Lapuk, L. A. Chistyakova and N. A. Kravchenko: Anal. Biochem., **24**, 80 (1968).
- 15) A. Patchonik, W. B. Lawson and B. Witkop: J. Am. Chem. Soc., **80**, 474 (1958).
- 16) T. F. Spande and B. Witkop: Methods in Enzymology, **XI**, 498 (1967).
- 17) T. E. Barman and D. E. Koshland, Jr: J. Biol.

- Chem., **242**, 5771 (1967).
- 18) E. Scoffone, A. Fontana and R. Rocchi: *Biochemistry*, **7**, 971 (1968).
 - 19) H. Matsubara and R. M. Sasaki: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **35**, 175 (1969).
 - 20) T. Y. Liu and Y. H. Chang: *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842 (1971).
 - 21) T. Y. Liu: *Methods in Enzymology*, XXV, 44 (1972).
 - 22) A. M. Crestfield, S. Moore and W. H. Stein: *J. Biol. Chem.*, **238**, 622 (1963).
 - 23) C. H. W. Hirs: *J. Biol. Chem.*, **219**, 611 (1956).
 - 24) S. Moore: *J. Biol. Chem.*, **238**, 235 (1963).
 - 25) A. S. Inglis and T. Y. Liu: *J. Biol. Chem.* **245**, 112 (1970).
 - 26) T. Y. Liu and A. S. Inglis: *Methods in Enzymology*, XXV, 55 (1972).
 - 27) Y. Okada and H. Hanafusa: *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **27**, 478 (1954).
 - 28) 実験化学講座, **23**, 163, 丸善 (1957).
 - 29) K. Baley: *Biochem. J. (London)*, **31**, 1406 (1937).
 - 30) E. W. Yemm and E. C. Cocking: *Analyst*, **80**, 209 (1955).
 - 31) C. H. W. Hirs, W. H. Stein and S. Moore: *J. Biol. Chem.*, **106**, 331 (1934).
 - 32) B. Kassel and M. Laskowski: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1996 (1961).
 - 33) E. J. Harfenist: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5528 (1953).
 - 34) E. J. Cohn and J. T. Edsall: *Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions*, Reinhold Publishing Company, New York, 1943.