

## スルメイカ肝臓の Cathepsin B の精製

稲葉 喬・原 松次・末永 邦雄・藤井 実

(生物化学教室)

昭年 49 年 11 月 20 日 受理

Purification of Cathepsin B from Liver of Sagittated Calamary

Takashi INABA, Matsuji HARA, Kunio SUENAGA and Minoru FUGII

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received November 20, 1974

### Summary

Cathepsin B from the liver of sagittated calamary, *Ommatostrephes saloani pacificus*, was purified by following steps: homogenization, ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose column chromatography, DEAE-cellulose column chromatography, CM-cellulose column rechromatography, Sephadex G-75 column chromatography and rechromatography. This procedure yielded the purified enzyme with a 0.09% recovery of the activity in original extracts. The purified enzyme appears to be homogeneous, when tested by disc electrophoresis at both pH 4.3 and pH 9.5. Specific activity of the enzyme was 5.34 unit/mg. The molecular weight of the enzyme from sagittated calamary was estimated to be considerably smaller than those of cathepsin B 1 from human liver, bovine spleen and liver, as judged from the result of its Sephadex G-75 column chromatography. The optimum pH for Bz-Arg·NH<sub>2</sub> hydrolysis by the enzyme was 4.5 in 0.1 M sodium acetate buffer and was 5.5 in 0.1 M phosphate buffer. The enzyme was strongly inactivated by alkylating reagents such as monoiodoacetate and N-ethylmaleimide even in the presence of 30 mM 2-mercaptoethylamine at pH 4.5. No inhibition of the enzyme was observed in the presence of 3.4 mM DFP.

### 結 言

1957年に Greenbaum と Fruton<sup>1)</sup> によって牛の脾臓に L-cysteine の存在下で trypsin の合成基質を加水分解する作用を有する cathepsin B が存在することが見出された。その後、cathepsin B はネズミの腎臓<sup>2)</sup> と肝臓<sup>3)</sup> の細胞の lysosome に局在していることが明らかにされた。1971 年に Barrett ら<sup>4)</sup> によって cathepsin B は、分子量と基質特異性の差異によって、cathepsin B1 と cathepsin B2 に分類された。前者は約 25,000 の分子量を有し、後者は約 50,000 の分子量を有することが報告されている。哺乳動物の cathepsin B1 は人の肝臓<sup>5)</sup>、牛の肝臓、牛の脾臓<sup>6-9)</sup> から精製されたが、タンパク質化学的に均一な標品はまだ得られていない。さらに、哺乳動物以外の動物の組織から cathepsin B を精製することはまだ試みられていない。

本論文において、自己消化が早いスルメイカの肝臓から cathepsin B を精製する方法ならびに精製された酵素の 2, 3 の酵素化学的性質について報告する。

† 本研究は昭和47年4月1日日本農芸化学会大会（仙台）において発表した。

## I. 実験方法

### 1. 実験材料と試薬

スルメイカ (*Ommatostrephes sloani pacificus*) の肝臓は水産庁西海区水産研究所 (長崎市) と鮮魚店 (佐賀市) から得て、使用するまでフリーザー中に保存した。

CM-cellulose と DEAE-cellulose は Brown 社から得た。Sephadex G-75 は Pharmacia の製品である。Benzoyl argininamide・HCl (Bz-Arg・NH<sub>2</sub>) は蛋白質研究奨励会 (大阪) から購入した。特級 monoiodoacetic acid と N-ethylmaleimide は半井化学薬品から得た。Diisopropylfluorophosphate (DFP) は Koch-Light Laboratories (England) の製品である。他のすべての試薬は市販の特級ないし 1 級品であり、そらに精製せず使用した。限外ろ過膜 (UM-2) は Amicon 社の製品である。

### 2. Cathepsin B の活性測定

**2-1 L-Cysteine 依存性と非依存性プロテアーゼ活性の測定** Anson<sup>10)</sup> の方法にしたがって、酸変性ヘモグロビンを基質として用いて 0.1M citrate-HCl 緩衝液 (pH 4.5) 中で、L-cysteine 存在下と非存在下において酵素反応を行わせた。反応中に生成した、trichloroacetic acid (TCA) 可溶性ペプチドによる 275nm における吸光度 ( $A_{275}$ ) を測定することによって cathepsin B の活性測定を行った。試験区分として、酵素液 400 $\mu$ l と 0.125M L-cysteine 100 $\mu$ l を含む混合液 (pH 4.5) を 30°C で 20 分間プリインキュベートした。その後、1.2% 酸変性ヘモグロビン溶液 (pH 4.5) 2.0ml を加えて酵素反応を開始した。30 分間反応させた後、その反応混合液に 0.44M TCA 水溶液 2.0ml を加えて反応を停止させた。30 分間静置した後、生じた沈澱をろ過によって除去し、得られた TCA 可溶区分の  $A_{275}$  を測定した。ブランクとして、酵素液 400 $\mu$ l と 0.125M L-cysteine 100 $\mu$ l を含む混合液を 30°C で 50 分間インキュベートした後、その混合液に 0.44M TCA 水溶液 2.0ml と 1.2% 酸変性ヘモグロビン 2.0ml を順次添加した。前記の試験区分と全く同じ操作によって、ブランク区分の  $A_{275}$  を測定した。試験区分の  $A_{275}$  からブランク区分の  $A_{275}$  を差引いた吸光度の増加分をもって L-cysteine 依存性プロテアーゼ活性とした。また、L-cysteine を含まない酵素反応混合液について、前記と同じ操作によって  $A_{275}$  の増加分を算出し、それをもって L-cysteine 非依存性プロテアーゼ活性とした。

**2-2 アミダーゼ活性の測定** 合成基質、Bz-Arg・NH<sub>2</sub> に cathepsin B を作用させ、生成した NH<sub>3</sub> を Conway の微量拡散法—Indophenol nitroprusside 発色法<sup>11)</sup> にしたがって発色させた後、 $A_{625}$  の増加を測定することによって cathepsin B のアミダーゼ活性を定量した。酵素液 100 $\mu$ l と 4mM EDTA・2Na を含む 0.16M 2-mercaptoethylamine 100 $\mu$ l から成る混合液 (pH 4.5) を 30°C で 20 分間プリインキュベートすることによって cathepsin B を活性化した後、50mM Bz-Arg・NH<sub>2</sub> 200 $\mu$ l を加えて酵素反応を開始した。20 分間インキュベートした後、その反応混合液から 200 $\mu$ l 分取し、生成した NH<sub>3</sub> を Conway の微量拡散法—Indophenol nitroprusside 法にしたがって定量した。なお、2-mercaptoethylamine を含まない反応混合液について、前記と同じ操作によって、生成した NH<sub>3</sub> の定量を行った。

### 3. 紫外吸収スペクトルの測定

cathepsin B 溶液 (0.01M 酢酸緩衝液, pH 4.7) の 220-340 nm における吸光度を 1.0 cm 石英セルとダブルビーム分光光度計 (日立, EPS-3T) を使用して測定した。

### 4. Disc ゲル電気泳動

Disc ゲル電気泳動は、Davis<sup>12)</sup> の方法にしたがって、7.5%ゲルのカラム 1 本当たり 200 $\mu$ g の酵素

を添加し、pH 4.3 と pH 9.5 において定電流 5mA/カラム通電して行われた。

### 5. 限外ろ過

限外ろ過膜 (UM-2) と限外ろ過加圧セル (220ml) を用いて  $3\text{kg}/\text{cm}^2$  の  $\text{N}_2$  ガスで加圧することによって、酵素液の限外濃縮を行なった。

### 6. 阻害実験

酵素液  $100\mu\text{l}$  と  $80\text{mM}$  の 2-mercaptoethylamine  $50\mu\text{l}$  を含む混合液 ( $0.1\text{M}$  酢酸緩衝液, pH 4.5) を  $30^\circ\text{C}$  で20分間プリインキュベートして cathepsin B を活性化した後、種々の濃度の阻害剤, monoiodoacetic acid, N-ethylmaleimide あるいは diisopropylfluorophosphate  $50\mu\text{l}$  を添加し、この混合液をさらに20分間インキュベートした。その後、この混合液に  $50\text{mM}$  Bz-Arg-NH<sub>2</sub>  $200\mu\text{l}$  加えて、 $30^\circ\text{C}$  で20分間酵素反応を行わせ、残存する酵素活性を前記のアミダーゼ活性測定法にしたがって定量した。対照として、阻害剤を含まない反応混合液について、同時に酵素反応を行わせて、そのアミダーゼ活性を定量した。

## 結 果

### 1. 精製

すべての操作は  $4\text{--}5^\circ\text{C}$  で行われた。

**第1段階. 抽出** スルメイカの肝臓に  $0.1\text{M}$  citrate-HCl 緩衝液 (pH 4.7) を肝臓重量当り2倍容量加えて、ワーリングブレンダーを用いてホモジナイズした。このホモジネートの pH を  $1\text{N}$  HCl あるいは  $1\text{N}$  NaOH を用いて4.7に調整した後、比較的大きな細胞断片を除去するために、ガーゼでろ過した。このろ液を  $6,000\times g$ , 20分間遠心分離することによって生じた最上層の脂肪層と沈でん層を除去し、濁った黄褐色の抽出液 (中間層) を得た。この抽出液をろ過補助剤, Celite 503, Standard super cel と Hyflo super cel を用いて吸引ろ過することによって褐色透明な抽出液を得た。

**第2段階. 硫酸分別** 第1段階における抽出液に結晶硫酸を機械的に攪拌しながら加えて30%硫酸飽和とした。1夜静置後、生じた沈でんを  $6,500\times g$  で20分間遠心分離することによって除去し、その上清にさらに硫酸を加えて60%硫酸飽和とした。生じた沈でんを遠心分離によって集めて、必要最少容量の  $0.01\text{M}$  酢酸緩衝液 (pH 4.7) に溶解した。この溶液を Visking チューブ (#36/32) を用いて、同じ緩衝液に対して、緩衝液を数回更新しながら透析することによって脱塩と平衡化を行った。透析中に生じた沈でんを遠心分離によって除去し、その上清を粗酵素液と呼んだ。

**第3段階. CM-cellulose カラムクロマトグラフィー** 第2段階において平衡化された粗酵素液を、前もって同じ条件に平衡化した CM-cellulose カラム ( $4.7\times 35\text{cm}$ ) に添加した。最初に  $0.01\text{M}$  酢酸緩衝液 (pH 4.7) を流してカラムを洗い、次に NaCl をそれぞれ  $0.1\text{M}$ ,  $0.2\text{M}$  および  $0.3\text{M}$  含む  $0.01\text{M}$  酢酸緩衝液 (pH 4.7) を用いて、カラムに吸着されているタンパク質を段階的に溶出した。その溶出パターンは Fig. 1 に示されている。タンパク質は7つのピークに分別され、それらを F-I~F-VII と分類した。F-II から F-V までの各画分に L-cysteine 非依存性プロテアーゼ活性が見出されたが、L-cysteine 依存性プロテアーゼ活性が最も高かった画分は F-V であった。この F-V を集めて、限外ろ過によって濃縮した。

**第4段階. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー** 第3段階で濃縮された酵素液 (F-V) を Visking チューブ (#36/32) を用いて  $0.01\text{M}$  酢酸緩衝液 (pH 4.7) に対して十分透析した。透析中に生じた沈でんは遠心分離によって除去した。その上清を同じ条件で平衡化した DEAE-

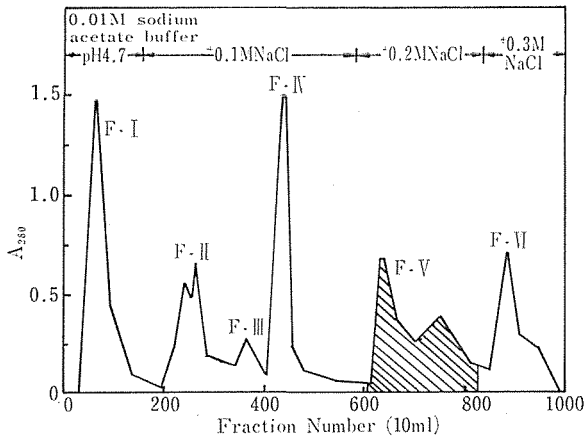


Fig. 1 CM-Cellulose Column Chromatography (4.7×3.5 cm)

cellulose カラム (3.8×41cm) に添加した。カラムに吸着したタンパク質を最初に 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) で溶出し、次に NaCl をそれぞれ 0.3M, 0.5M および 1.0M 含む 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) で段階的に溶出した。酵素活性はアミダーゼ活性測定法によって定量した。その溶出パターンを Fig. 2 に示す。Fig. 2 に見られるように、酵素活性は素通りの画分のみ見出された。この画分を集めて限外ろ過によって濃縮した。

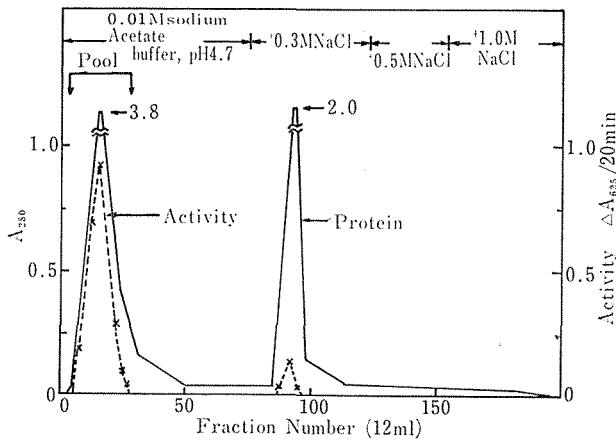


Fig. 2 DEAE-Cellulose Column Chromatography (3.8×41 cm)

**第5段階. CM-cellulose 再クロマトグラフィー** 第4段階で濃縮した酵素液を 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) で平衡化した CM-cellulose カラム (2.8×30cm) に添加した後、カラムに吸着されたタンパク質を最初に 0.1M NaCl を含む 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) で溶出し、次に NaCl の濃度を 0.1M から 0.3M まで連続的にしかも直線的に上げて溶出した。その詳しい溶出パターンを Fig. 3 に示す。Fig. 3 に見られるように、cathepsin B は NaCl 濃度 0.15M 附近で溶出されたが、そのピークは他のタンパク質のピークと重なっていた。酵素活性をタンパク質のパターンとが一致した画分を集めて、限外ろ過によって濃縮した。

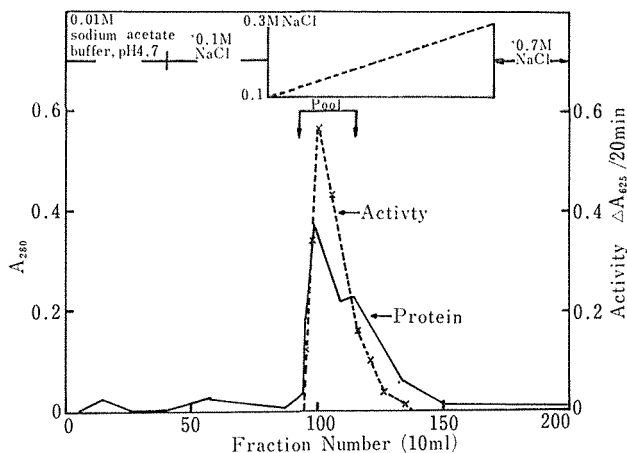


Fig. 3 CM-Cellulose Column Rechromatography

第6段階. **Sephadex G-75** カラムクロマトグラフィー Sephadex G-75 は Pharmacia Co. の資料にもとづいて膨潤させた後, 0.1M NaCl を含む 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) で平衡化した. 第5段階で濃縮した酵素液を上記のように平衡化したカラム (2.5×90cm) に添加し, 同じ緩衝液を用いて上昇法によって溶出した. その溶出パターンを Fig. 4 に示す. 酵素活性を有す

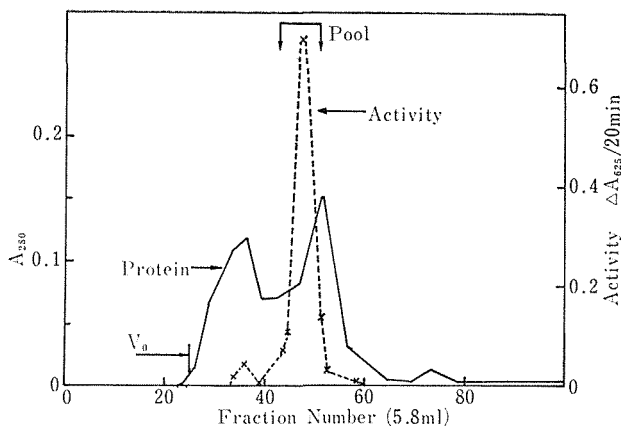


Fig. 4 Sephadex G-75 Column Chromatography (2.5×90 cm)

る画分を集めて, 限外ろ過によって濃縮した. 濃縮された酵素液について, pH 4.3 で disc ゲル電気泳動を行った結果, 濃く染色された一本のバンドの他に薄く染色された2本のバンドが観察された.

第7段階. **Sephadex G-75** 再クロマトグラフィー. 第6段階で濃縮された酵素液について, 再び第6段階と同一条件下でクロマトグラフィーを行った. その溶出パターンを Fig. 5 に示す. Fig. 5 に見られるように, フラクシオン番号46に酵素活性のピークが観察された. このピークの前半部は後半部比べて比活性が高かったので, 前半部の分画を集めて限外ろ過によって濃縮した. この濃縮液を最終精製酵素液として実験に使用した. なお, 精製過程における酵素活性の収量は Table 1 にまとめられている. 硫酸分別後の脱塩・平衡化の過程で全酵素活性の収量が極度に低下した.

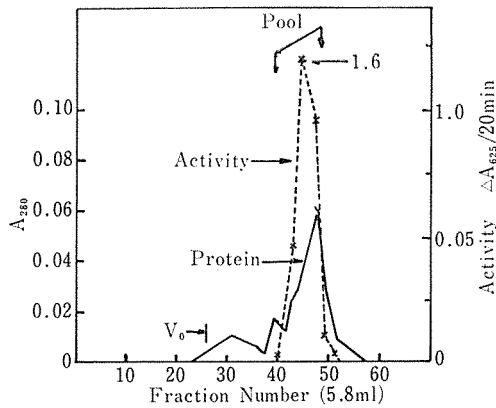


Fig. 5 Sephadex G-75 Column Rechromatography (2.5×90 cm)

Table 1. Purification of Cathepsin B from *O. sloani pacificus*

Steps	Volume (ml)	Activity (units/mg)	Protein (mg/ml)	Total units	Specific (Activity) (units/mg)	Purification	Yield %
1. Original extract	5,028	0.53	19.7	2,665	0.027	1	100
2. Ammonium sulfate (30-60%)	577	3.8	36.8	2,193	0.103	3.8	82
3. CM-cellulose column chromatography	96	1.38	5.44	133	0.230	8.5	4.9
4. DEAE-cellulose column chromatography	96	0.64	2.24	63	0.295	10.9	2.3
5. CM-cellulose column rechromatography	9.0	0.63	1.83	5.7	0.344	12.7	0.21
6. Sephadex G-75 column chromatography	8.8	0.457	0.30	3.96	1.49	55.0	0.14
7. Sephadex G-75 column rechromatography	5.7	0.406	0.076	2.31	5.34	197.0	0.09

One unit: Enzyme amount required to form one micromole of  $\text{NH}_3$  per minute at  $30^\circ\text{C}$  under the assay condition.

## 2. Disc ゲル電気泳動

最終精製酵素の純度を検定するために、pH 4.3 と pH 9.5 において、7.5%ゲル濃度で disc ゲル電気泳動を行った。その結果を Fig. 6 に示す。Fig. 6 に見られるように、両 pH において単一のバンドが観察された。

## 3. 紫外吸収スペクトル

精製酵素は 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 中で単純タンパク質特有の紫外吸収曲線 (Fig. 7) を示し、 $A_{280}/A_{260}=2.2$  であった。

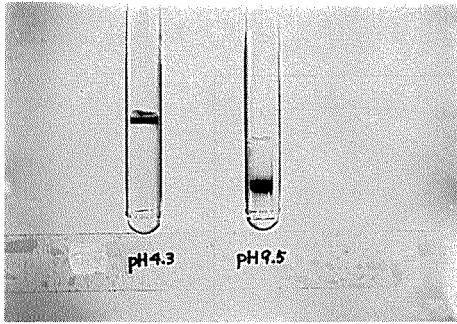


Fig. 6 Disc electrophoresis of purified Cathepsin B

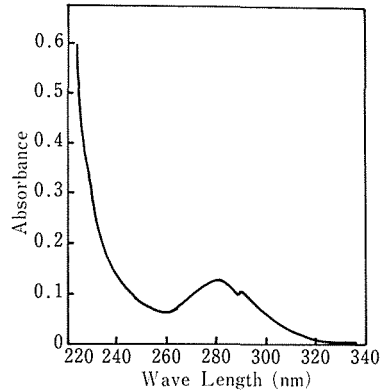


Fig. 7 Absorption Spectrum of Purified Enzyme Solution

#### 4. 反応速度に及ぼす pH の影響

Bz-Arg·NH<sub>2</sub> の加水分解に及ぼす pH の影響を 0.1M 酢酸緩衝液を用いて調べた結果を Fig. 8 に示す. Fig. 8 に見られるように, 本酵素による Bz-Arg·NH<sub>2</sub> の加水分解は pH に大きく依存しており, その最適 pH は 4.5 であった. また, 0.1M リン酸緩衝液を用いて同じ基質の加水分解に及ぼす pH の影響を調べた結果を Fig. 9 に示す. この場合, 最適 pH は 5.6 であった.

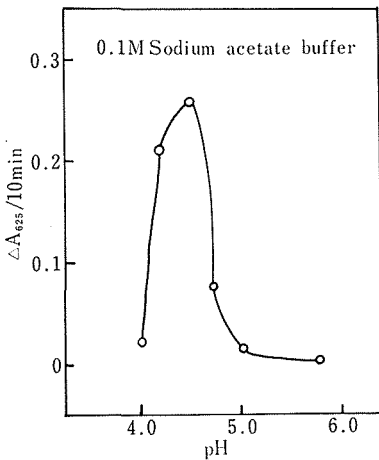


Fig. 8 Activity of Cathepsin B as a Function of pH

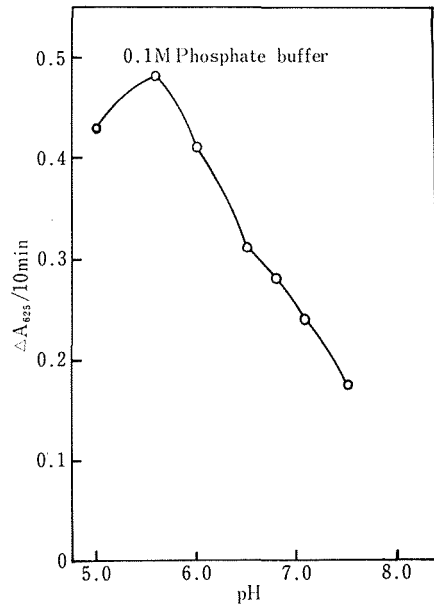


Fig. 9 Activity of Cathepsin B as a Function of pH

#### 5. Cathepsin B の活性化の 2-mercaptoethylamine 濃度依存性

種々の濃度の 2-mercaptoethylamine の存在下で精製酵素を活性化した後, Bz-Arg·NH を基質として用いてアミダーゼ活性を測定した. その結果を Fig. 10 に示す. 2-mercaptoethylamine が 10mM 以下の範囲では, cathepsin B の活性化は 2-mercaptoethylamine の濃度に依存したが,

10mM 以上の範囲ではその濃度に関係なく, cathepsin B は100%活性化された.

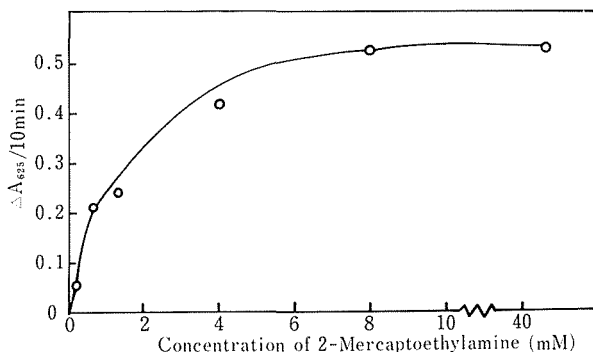


Fig. 10 Activity of Cathepsin B as a Function of 2-Mercaptoethylamine Concentration

### 6. 反応速度に及ぼす各種阻害剤の影響

Fig. 11 は種々の濃度の monoiodoacetic acid の存在下における cathepsin B の相対的活性を示したものである. pH 4.5 において,  $0.5\mu\text{M}$  の monoiodoacetic acid の存在下で酵素活性は76%残存したが,  $5\mu\text{M}$  の存在下では残存活性は16%に低下した. Fig. 12 は種々の濃度の N-

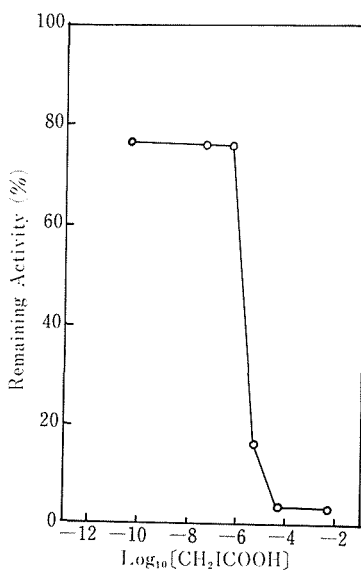


Fig. 11 Effect of Monoiodoacetic acid on Activity of Cathepsin B

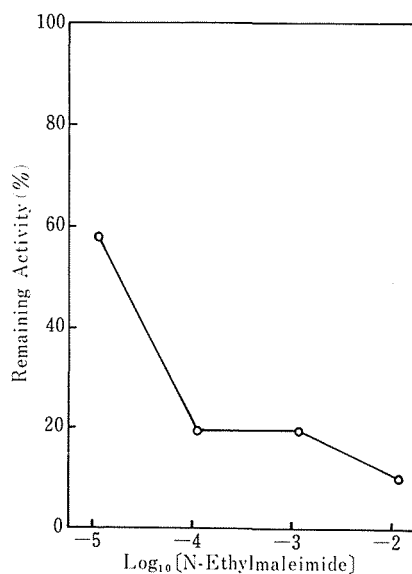


Fig. 12 Effect of N-Ethylmaleimide on Activity of Cathepsin B

ethylmaleimide の存在下における相対的酵素活性を示したものである.  $160\mu\text{M}$  の N-ethylmaleimide の存在下で, cathepsin B の残存活性は19%であった. なお, 種々の濃度の DFP の存在下における酵素活性を調べた結果,  $3.4\text{mM}$  DFP によって cathepsin B は何らの影響も及ばされなかった.



## 考 察

自己消化がかなり早いスルメイカの肝臓から前記の精製法によって cathepsin B の精製を試みた。最終的に精製されたスルメイカ肝臓の cathepsin B は disc ゲル電気泳動的に均一であった。また、pH 4.3 における泳動においてその易動度が小さかったことから、本酵素は pH 4.3 附近にその等電点を有するタンパク質であると考えられる。Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィー (Fig. 5) において、cathepsin B は Blue Dextran を用いてあらかじめ求められた void volume の約1.8倍の溶出容量でカラムから溶出されたことから、その分子量はウマ心臓の myoglobin の分子量16,890に近い値であろうと推定される<sup>13)</sup>。

cathepsin B は哺乳動物の臓器、人の肝臓<sup>3)</sup>、牛の肝臓および牛の脾臓<sup>6-9)</sup>からかなり高度に精製されているが、まだタンパク質化学的に均一に得られていない。これらの哺乳動物の臓器の cathepsin B は2種類見出されており、分子量が約25,000のものを cathepsin B1、また分子量が約50,000のものを cathepsin B2 とそれぞれ呼んでいる。したがって、スルメイカ肝臓の cathepsin B は哺乳動物の cathepsin B1 よりも小さく、おそらくこれまでに見出されているタンパク質加水分解酵素のうちで最も小さなものであるという新たな発見を暗示しているように思われる。cathepsin B の精製過程、とくに硫酸分別後の脱塩・平衡化において全酵素活性の収量が極度に低下した (Table 1)。脱塩・平衡化に使用した Visking チューブは、タンパク質によって程度の差はあるが、分子量25,000以下のタンパク質を透過することが知られている<sup>14)</sup>。したがって、この全酵素活性の収量の低下の原因として本酵素が透析中に Visking チューブの膜を透過したことが考えよう。Visking チューブの代わりに Sephadex G-25 を用いるゲルろ過によって脱塩・平衡化を行うことによって、cathepsin B の活性の損失を防止できるので、今後その精製法を若干改善する必要がある。

cathepsin B の最適 pH は 0.1M 酢酸緩衝液を用いた場合4.5であり、0.1M リン酸緩衝液を用いた場合5.5であったという事実は、哺乳動物の cathepsin B1 の最適 pH が6.0~6.5であるという報告<sup>4)</sup>された事実と相違している。

スルメイカ肝臓から精製された cathepsin B についてこれまでに得られた知見だけから判断しても、本酵素は哺乳動物の cathepsin B1 および cathepsin B2 とかなり異ったタンパク質であると考えられる。

cathepsin B は pH4.5 で 30mM の 2-mercaptoethylamine の存在下で monoiodoacetic acid と N-ethylmaleimide によって強く阻害された。monoiodoacetic acid と N-ethylmaleimide はいずれも pH7-8.5 においてタンパク質分子中の Cys 残基をアルキル化して、S-アルキル誘導体を生成すること、また両化合物は pH6.5 附近で His 残基をアルキル化して、N-アルキル誘導体を生成することが知られている<sup>15)</sup>。したがって、上記の条件下では Cys 残基よりも His 残基の修飾が起っている可能性が考えられる。しかしながら、cathepsin B の活性発現に直接関与している Cys 残基が他の Cys 残基よりも異常に高い反応性を示すならば、高濃度の低分子化合物 2-mercaptoethylamine の存在下においても、monoiodoacetic acid あるいは N-ethylmaleimide によって活性発現に関与している Cys 残基が修飾され、その結果上記の両化合物によって酵素活性が阻害されるという可能性も考えられる。

DFP によって酵素活性の阻害が全く起らなかったことから、cathepsin B の活性発現に Ser 残基は直接関与していないと思われる。

本酵素の精製法の改良、そのタンパク質化学的および酵素化学的特性についてさらに詳細に実験し、それらを別報で報告する。

## 摘 要

スルメイカの肝臓から cathepsin B を以下の操作すなわち homogenization, 硫酸塩析による分別, CM-cellulose カラムクロマトグラフィー, CM-cellulose カラム再クロマトグラフィー, Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーと再クロマトグラフィーによって精製した。精製された酵素の収量は抽出原液の全活性の0.09%であった。この精製酵素は、pH 4.3 と pH 9.5 における disc ゲル電気泳動の結果から、均一であると思われる。この酵素の比活性は 5.34 unit/mg であった。スルメイカの肝臓の cathepsin B の分子量は人の肝臓、牛の肝臓と脾臓から得られた cathepsin B1 の分子量に比べてかなり小さいものと推定される。この酵素による Bz-Arg-NH<sub>2</sub> の加水分解の最適 pH は 0.1M 酢酸緩衝液中で4.5であり、また 0.1M リン酸緩衝液中で5.5であった。この酵素は、pH4.5 においてアルキル化剤である monoiodoacetic acid および N-ethylmaleimide によって、30mM の 2-mercaptoethylamine の存在下でさえ、強く不活性化された。しかしながら、この酵素活性は DFP によって何らの阻害も受けなかった。

## 謝 辞

スルメイカの肝臓を提供して頂いた水産庁西海区水産研究所と島内鮮魚店に対して厚くお礼を申しあげる。

## 文 献

- 1) Greenbaum, L. M. and Fruton, J. S., *J. Biol. Chem.*, **226**, 173, 180 (1957)
- 2) Shibuko, S. and Tappel, A. L., *Biochem. J.*, **95**, 731 (1965)
- 3) Bouma, J. M. W. and Gruber, M., *Acta. Biochim. Biophys.*, **113**, 350 (1966)
- 4) Barrett, A. J., *Tissue Proteinases* (Barrett, A. J. and Dingle, J. T. eds.) p. 109-133 (1971), North-Holland Publishing Co., Amsterdam
- 5) Barrett, A. J., *Biochem. J.*, **131**, 809 (1973)
- 6) Otto, K., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1449 (1967)
- 7) Keilová, H., *Tissue Proteinases* (Barrett, A. J. and Dingle, J. T. eds.) p. 45-68 (1971), North-Holland Publishing Co., Amsterdam
- 8) Snellman, O., *Biochem. J.*, **114**, 673 (1969)
- 9) McDonald, J. K., Reilly, T. J., Zeitman, B. B. and Ellis, S., *J. Biol. Chem.*, **243**, 2028 (1968)
- 10) Anson, M. L., *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79 (1938)
- 11) 石坂音治, 微量拡散分析試験法, p. 13-22 (1969), 南江堂, 東京
- 12) Davis, B. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 13) Bailey, J. L., *Techniques in Protein Chemistry*, p. 273 (1967), Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York
- 14) Craig, L. C., King, T. P. and Stracker, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3729 (1957)
- 15) Scoffone, E. and Fontana, A., *Protein Sequence Determination*, p. 197-199 (1970), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York