

牛 α -ラクトアルブミンの分子内SS結合の 選択的切断による構造変化と溶解性変化

早川 茂, 横関高資, 今出 保

CHANGES IN THE CONFORMATION AND THE SOLUBILITY CAUSED BY THE SELECTIVE REDUCTION OF THE INTRA-MOLECULAR DISULFIDE BONDS OF BOVINE α -LACTALBUMIN

Shigeru HAYAKAWA, Takashi YOKOZEKI and
Tamotsu IMADE

It was attempted to clarify the relationships between the conformational changes and the solubility of the α -LA selectively disrupted disulfide bonds.

Three disulfides species (3SS α -LA) lacking in one SS(6-120) was obtained by the treatment with DTT and Ca^{2+} . Two species possessing less than two disulfides (1-2SS and 0-1SS α -LA) were obtained by the treatment with DTT and EDTA.

From the results of CD and fluorescence spectra and competitive ELISA assay, it can be suggested that 3SS α -LA possesses almost the same conformation as 4SS α -LA, whereas 1-2SS and 0-1SS α -LA shows the quite unfolded structure.

While 3SS α -LA showed no solubility loss in the isoelectric regions, 1-2SS and 0-1SS α -LA extremely lost their solubility in the isoelectric regions.

It was suggested that the disruption of two disulfide bonds induced the conformational changes of α -LA and led to the solubility loss.

分子内SS結合の選択的切断による α -LAの構造変化と溶解性の変化との関連を調べた。

Ca^{2+} 存在下におけるSS還元剤 (DTT) の作用により、1本のSS結合 (6-120) が切断された3SS α -LAが選択的に得られた。また、EDTA存在下においてDTTの反応時間を変えることにより0-2本のSS結合が残存する1-2SS α -LAと0-1SS α -LAが得られた。

3SS α -LAはCDスペクトル、蛍光スペクトルおよびELISA競合試験の結果より、4SS α -LAとほぼ同じ構造であることが示された。

1-2SSと0-1SS α -LAのCDスペクトル、蛍光スペクトルはいずれも大きな構造の変化があることを示した。ELISA競合試験においても両 α -LAとも表面構造が著しく変化していることを示した。

3SS α -LAにおける等電点付近の溶解度は4SS α -LAと同様に極めて高かったが、1-2SSと0-1SS α -LAでは著しく低下した。

以上の結果より、 α -LAの4本の分子内SS結合のうち2本以上が切断されることにより構造が大きく変化し、溶解度の著しい低下が起きることが明かとなった。

結 言

食品蛋白質の機能特性は食品加工において重要な性質であり、蛋白質の溶解性はその中でも特に重要な因子となっている⁽¹⁾。蛋白質の機能特性に大きな寄与をしている蛋白質の性質はその環境変化(pH変化, 加熱, 加圧, 塩および還元剤の添加, 変性剤および界面活性剤処理等)により影響を受けるが, 細胞外に分泌される蛋白質の多くは分子内SS結合により安定化されているため変化を受けにくいと考えられている⁽²⁾。

蛋白質工学的にSS結合を導入したファージリゾチームは野生型よりも熱に対する安定性が飛躍的に増大し⁽³⁾, 蛋白質工学的にSS結合を一部欠損させたヒトリゾチームでは活性が著しく低下した⁽⁴⁾と報告されている。また, 組み換えDNA法によって大腸菌で発現された蛋白質の多くは細胞内で正しいSS結合が形成されないために菌体内で不溶化することが知られている⁽⁵⁾。

蛋白質の分子内SS結合の切断により起きる構造の変化と溶解性との関連についてはこれまで報告されていない。そこで, α -ラクトアルブミンをモデル蛋白質として用い, 4個ある分子内SS結合を選択的に切断・修飾した改変蛋白質を調製する方法を確立し, 改変蛋白質の構造変化と溶解性の変化の関連を明らかにしようとした。

実 験 方 法

材料: α -ラクトアルブミン(α -LA)は生牛乳からPhenyl Sepharose CL-4Bを用いた疎水性クロマト法⁽⁶⁾により調製した。 α -LA溶液の濃度は280nmにおける吸光係数($E_{1\%}^{1cm}=20.1$)⁽⁷⁾あるいはLowryらの方法⁽⁸⁾を用いて測定した。ジチオスレイトール(DTT), ヨードアセトアミド(IAM), ヨード酢酸(IAA)は和光純薬から, N-iodoacetyl-N'-(8-sulfo-1-naphthyl) ethylene-diamine (I-AEDANS)はAldrichから, トリプシンはSigma (T8642)からそれぞれ購入した。

SS結合の切断: 1 mM CaCl_2 あるいは1 mM EDTAを含む10 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)に1.2 mg/mlになるように α -LAを溶解し, DTTを1 mMになるように加え, 25℃において所定の時間窒素下で保持した。出現するSH基はHabeebの方法⁽⁹⁾に従って測定した。即ち, DTT処理 α -LA溶液に同量の20% TCAを加え, 遠心分離(1000 g, 10 min)により沈殿を集め, 10% TCAで洗浄した後2% SDSと4 mM EDTAを含むトリス塩酸緩衝液(pH7.5)を加えて沈殿を溶解し, Ellman試薬を加えて発色させ, 412 nmにて吸光度を測定した。モル吸光係数 $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いてSH基量を計算した。

修飾 α -LAの調製: 所定の時間 CaCl_2 あるいはEDTA存在下でDTT処理をした α -LA溶液に5 mMとなるようIAMを加え, 暗所で1時間攪拌して出現SH基を保護した後, 冷暗所で2昼夜50 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)に対して透析し, 修飾 α -LAを得た。

修飾 α -LA中の残存SS結合数の算定: 修飾 α -LA中に残存しているSS結合数をCreightonによる尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁽¹⁰⁾を用いて求めた。泳動は9%ゲルを用いて, 10 mA/cm²の定電流で3.5時間行った。

AEDANS修飾 α -LAのトリプシンによる加水分解: α -LAを CaCl_2 存在下でDTT処理することにより出現したSH基を蛍光試薬I-AEDANSで保護し, 過剰のI-AEDANSをSephadex G25によるゲルろ過により除去した。得られた修飾 α -LA中に残存するすべてのSS結合を8 M尿素, 1 mM EDTAと10 mM DTTを含む50 mM トリス塩酸緩衝液(pH

8.0) 中で切断し、出現するSH基をIAMにより保護し、過剰のIAMをSephadex G25によるゲルろ過により除去することによりAEDANS修飾 α -LAを得た。これを50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) 中で37℃、2時間トリプシン (1/100) により加水分解した。

ゲルろ過：トリプシンにより加水分解を受けたペプチドをCellulofine GCL-300mカラム (2×54cm) を用いたゲルろ過により分画し、500nmにおける蛍光強度 (励起波長340nm) と280nmにおける吸光度を測定した。低分子ペプチド画分についてはSephadex G25カラム (1.2×65cm) を用いてさらに分画し、同様に蛍光強度と吸光度を測定した。両ゲルろ過とも溶出液として50mMトリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を用いて行った。

HPLC測定：ペプチド画分をHPLCカラム (Cosmosil C₁₈-300) を用いてさらに精製した。溶出は0.2%トリクロロ酢酸を含む1-60%アセトニトリルを用いて日本分光高速液体クロマト (JASCO 880PU) により行い、220nmにおける吸光度と500nmにおける蛍光強度 (励起波長340nm) を測定した。

アミノ酸配列の分析：精製したペプチドのアミノ酸配列をプロテインシーケンサー (ABI 477A/120A) により分析した。

CDスペクトル測定：CDスペクトルは蛋白質濃度0.2mg/mlにおいてCa存在下で分光偏光光度計 (JASCO J-20C) を用いて測定した。200nmから240nmの2nm間隔の21点で得られたモル橢円率を用いてChangらの方法⁽¹¹⁾に従って二次構造含量を求めた。

蛍光スペクトル測定：蛍光分光光度計 (JASCO FP770) を用いて、Ca存在下で蛋白質濃度0.2mg/ml、励起波長280nmにおいて300～400nmの間の蛍光強度を測定することにより蛍光スペクトルを調べた。

修飾 α -LAの酵素免疫測定：3SS α -LA 2mgを完全フロイドアジュバントを用いて雌ウサギに注射し、さらに2週間毎に7回2mg 3SS α -LAを含む不完全フロイドアジュバントを用いて追加免疫をすることにより3SS α -LAに対する抗血清を作製した。抗血清の抗体価は酵素免疫法 (ELISA)⁽¹²⁾を用いて確かめた。100 μ gの抗原をマイクロプレートウェルに吸着させ、これに1:200～1:1000000に希釈した抗血清を結合させ、さらにパーオキシダーゼを結合した2次抗体を結合させた後、*o*-フェニレンジアミンを基質として反応させて492nmにおける吸光度を測定した。競合ELISAは10⁻⁴倍に希釈した抗血清100 μ lに1/2づつに希釈した修飾 α -LA (0.5mg/ml) を1 μ l加えて抗体をある程度中和した抗血清を用いることにより行った。

溶解度測定：修飾 α -LAを10mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、2mg/mlになるように濃度を調整した。同量の100mM酢酸緩衝液 (pH4～6) を加え、室温で1時間静置した後、10,000g、10分間遠心分離を行った。同量の蒸留水を加えたものをコントロールとして行った。得られた上清のpHを測定し、上清中の蛋白質量をLowryらの方法⁽⁸⁾により測定した。上清中の蛋白質量のコントロールに対する百分率でもって溶解度を示した。

結果および考察

修飾 α -LAの調製の検討

α -LAは123個のアミノ酸からなる1本のポリペプチド鎖であり、8個のシステイン残基が4本の分子内SS結合 (6-120, 28-111, 61-77, 73-91) を形成している⁽¹³⁾。これらSS結合は変性剤のない穏やかな条件で比較的低濃度の還元剤 (ジチオエリスリトール) で切断されることが知られている⁽¹⁴⁾。 α -LAはカルシウム (Ca) 結合蛋白質であることが知られており、Ca結合型では安定な構造をとり⁽¹⁵⁾、Caのないアポ型では内部の特異的疎水性領域が分子表面に露出するために不安定な構造をとると考えられている⁽¹⁶⁾。そこで、Caの存在下とキレート剤であるEDTA存在下において低濃度のジチオスレイトール (DTT) を α -LAに作用させた。

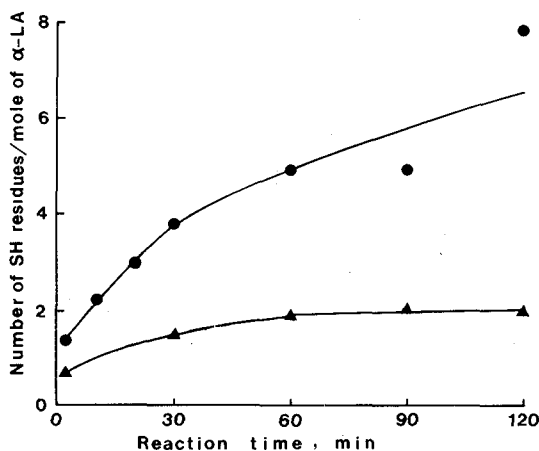


Fig.1 Developments of sulfhydryl groups in α -lactalbumin (α -LA) treated with Dithiothreitol(DTT) in the presence of Ca^{2+} (▲) or EDTA (●) at 25 °C

図1に見られるように、EDTA存在下では30分の反応において2本のSS結合に相当する約4個のSH基が生じ、120分ではほぼ全てのSS結合が切断を受けることが示された。一方、Ca存在下では構造的安定性のために120分の反応においてもほぼ1本のSS結合に相当するSH基しか検出されなかった。

そこで、1 mM DTTと1 mM EDTAの存在下において25°C、30分間および120分間処理し、生じたSH基をIAMで保護した試料を得た。また1 mM DTTと1 mM Ca存在下において25°C、30分間処理し、IAMで保護した試料を得た。

残存するSS結合の数を調べるためにこれら試料のCreightonによる尿素-PAGE法⁽¹⁰⁾を行った結果を図2に示した。Ca存在下で得られた試料は3本のSS結合が残っていることが分かり、これを3 SS α -LAとした。EDTA存在下で30分の処理で得られた試料は主として1本と2本のSS結合が残っていることが示され、これを1-2 SS α -LAとした。EDTA存在下で120分間の処理で得られた試料は主として0本と1本のSS結合しか持たないことが示され、これを0-1 SS α -LAとした。

3 SS α -LAのSS結合切断位置の確認

これまでの報告において、 α -LAの4本のSS結合のうちN末端とC末端近くにかかっているSS結合(6-120)が最も切断を受けやすいことが示唆されている^(14,17)。そこで、ここで得られた3 SS α -LAのSS結合の切断位置が最も切断を受けやすいSS結合(6-120)であるかどうかの検討を行った。

蛍光試薬でSH基を保護した3 SS α -LAのトリプシン分解物のCellulofine GCL-300mによるゲルろ過溶出パターンを図3に示した。ペプチドは280nmの吸光度では5つのピークに分かれることが示された。このうちの2つのピークに高い蛍光強度が示された。

より高分子側の140~160mlの範囲に溶出されるピークは同じカラムによりリクロマトされた。低分子側のピークはSephadex G25カラムによりリクロマトされ、その溶出パターンを図4に示した。280nmにおける吸光度では一つのピークのみが示されたが、蛍光測定では2つのピークが示された。それぞれのピークを集め、リクロマトを行った。

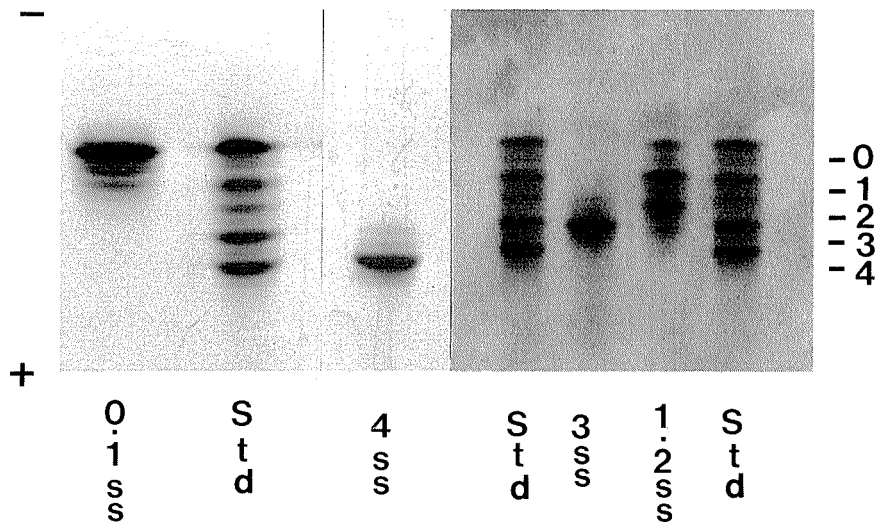


Fig.2. Urea PAGE patterns for the estimation of the number of developed sulfhydryl groups in α -LA treated with DTT. 4SS represents to native α -LA. 3SS was obtained by the treatment of α -LA with DTT in the presence of Ca^{2+} at 25 °C for 30min. 1-2SS and 0-1SS were obtained by the treatment of α -LA with DTT in the presence of EDTA at 25°C for 30min and 120min, respectively. The standard α -LA (Std) with the integral number of modified disulfide bonds was prepared by the method of Creighton⁽¹⁰⁾.

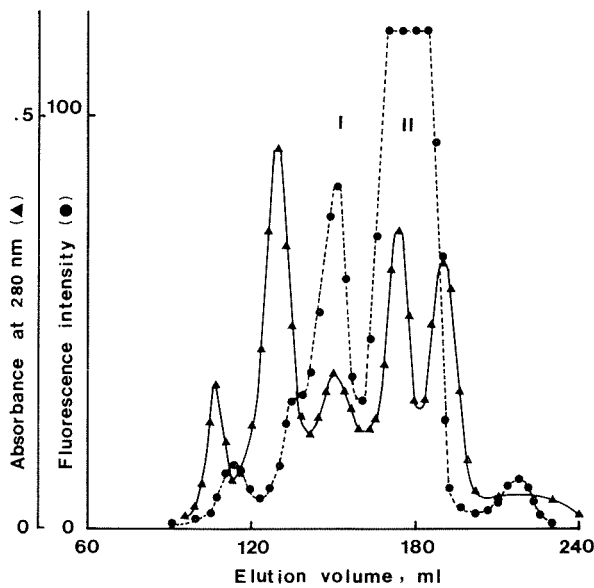


Fig.3. Gel filtration patterns of tryptic peptides of 3SS α -LA modified with the fluorescence probe on a Cellulofine GCL300 column. Each fraction was measured the absorbance at 280nm (▲) and fluorescence intensity at 500nm (●).

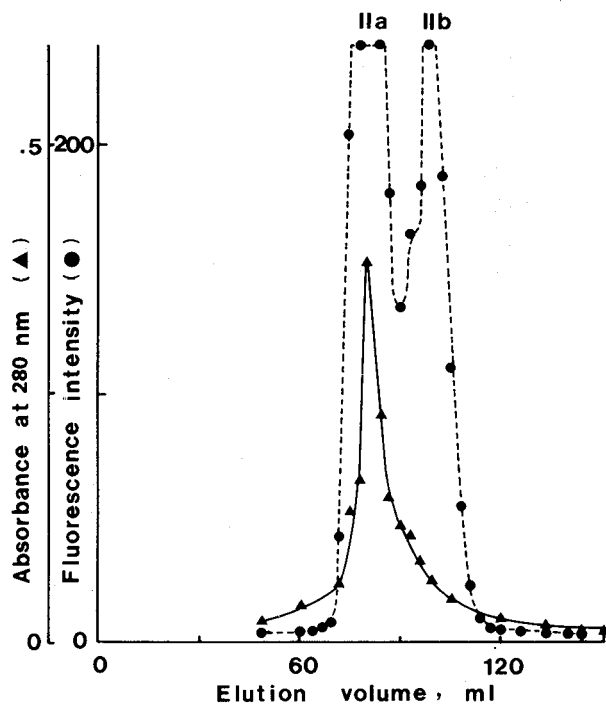


Fig.4 Gel filtration patterns of peptide fraction II obtained by the Cellulofine GCL300 gel filtration
Each fraction was measured the absorbance at 280nm (▲) and fluorescence intensity at 500nm (●).

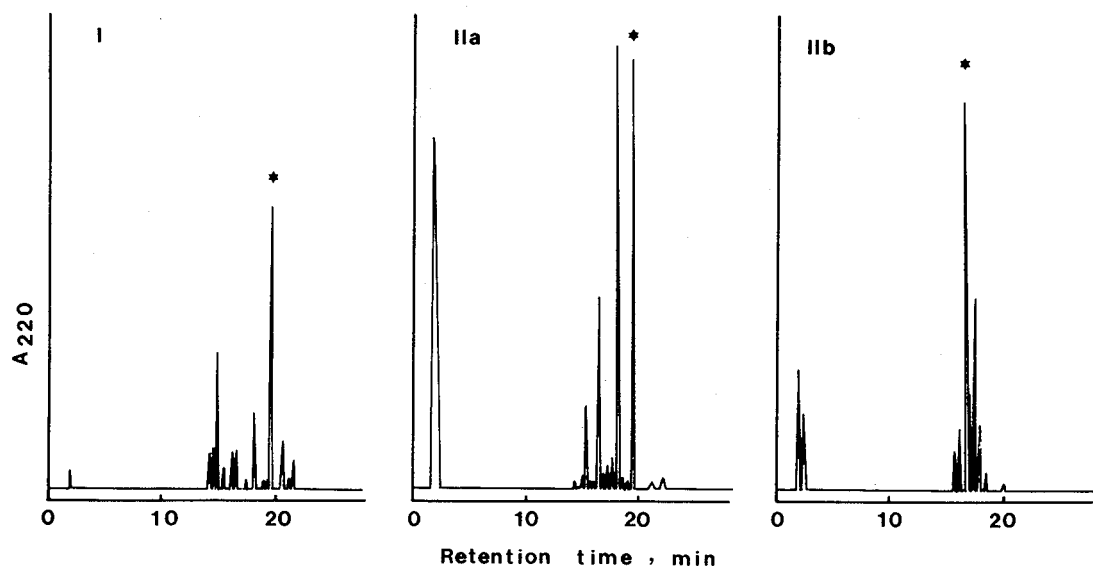


Fig.5 HPLC elution patterns of peptide fractions I, IIa and IIb obtained by the gel filtrations. Eluate was monitored by the absorbance at 220nm and fluorescence intensity at 500nm.

Star marks indicated the peaks possessing fluorescence.

高分子側の成分と低分子側の2成分についてHPLCを用いてさらに精製した。各成分とも蛍光を有する単一のピークが得られ(図5), これらをさらにHPLCにより精製し, それぞれをI, II a, II bペプチドとした。

精製ペプチドのアミノ酸配列をシーケンサーにより分析したところ, 図6に見られるようにI, II a, II bそれぞれ14個, 8個, 5個のアミノ酸からなるペプチドであることが明かとなった。 α -LAの一次構造⁽¹³⁾からペプチドIは109-122, II aは115-122に相当するペプチドであった。一部重複する部分が存在するが, これは, 114番目のリジンに隣接する酸性アミノ酸によりトリプシン分解が妨げられたためであると考えられる。またペプチドII bは6-10に相当するペプチドであることが示された。

これらの結果から, 3 SS α -LAにおいてはSS結合(6-120)が選択的に切断を受けたことが確認された。その他の修飾 α -LAの切断されたSS結合の位置については現在検討中である。

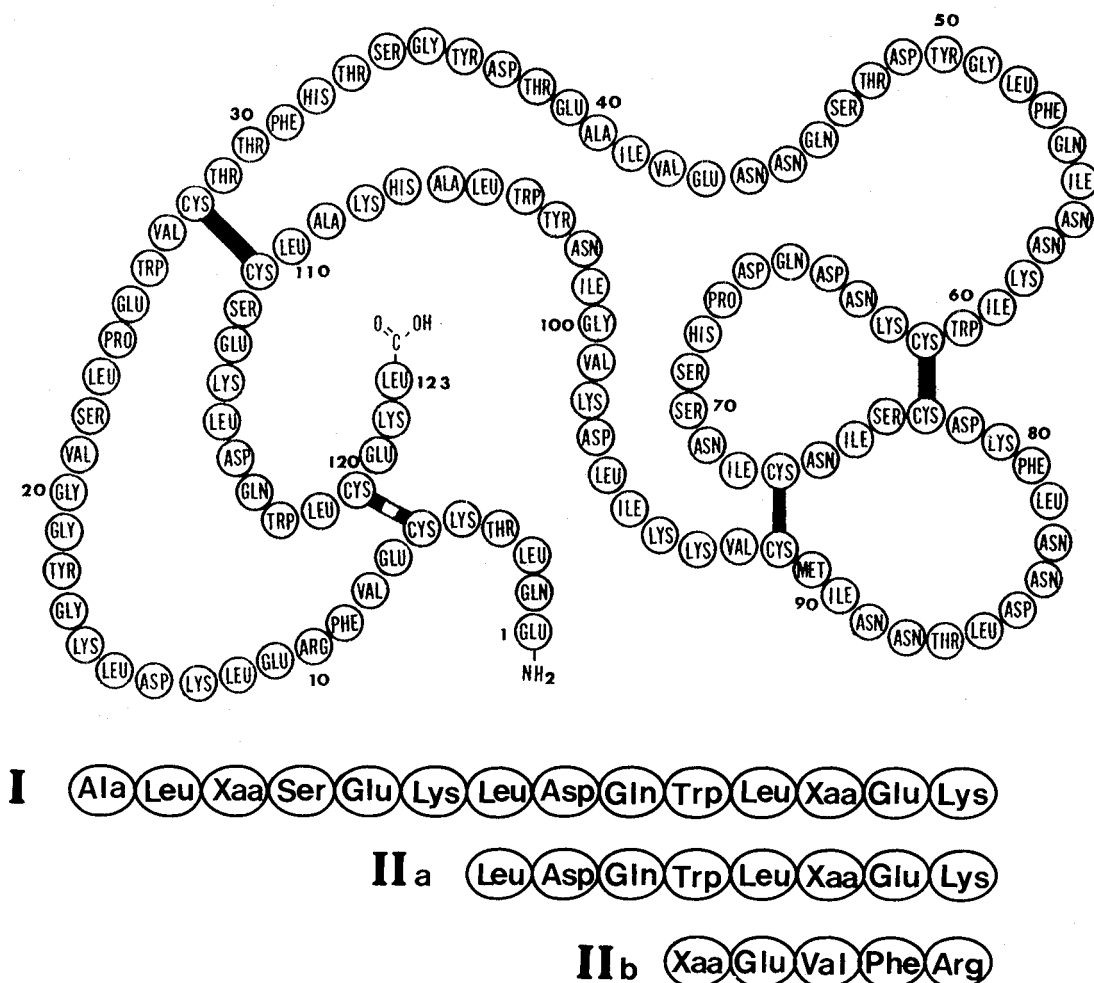


Fig.6. Primary structure of α -LA⁽¹³⁾ and the predicted amino acid sequence of fluorescent peptides isolated from the peptide I, II a and II b. Xaa represents unidentified amino acid because of no standard PTC - amino acid for S-AEDANS cysteine

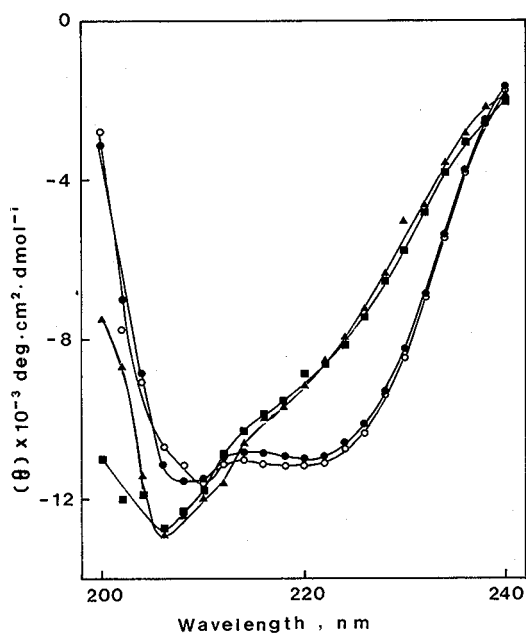
修飾 α -LAの構造変化

修飾, 未修飾蛋白質のCDスペクトルを図7に示した。4SS α -LAと3SS α -LAは極めてよく似たスペクトルを示した。一方, 1-2SS α -LAと0-1SS α -LAのCDスペクトルは未修飾のものよりも220nm付近の負の極大率が大きく低下した。Caを含まないアポ型にすると4SS α -LAと3SS α -LAは220nm付近の負の極大率が大きく低下する(図には示していない)ので, 4SS α -LA⁽¹⁵⁾と同様に3SS α -LAもCaによって構造が安定化されていることが示された。

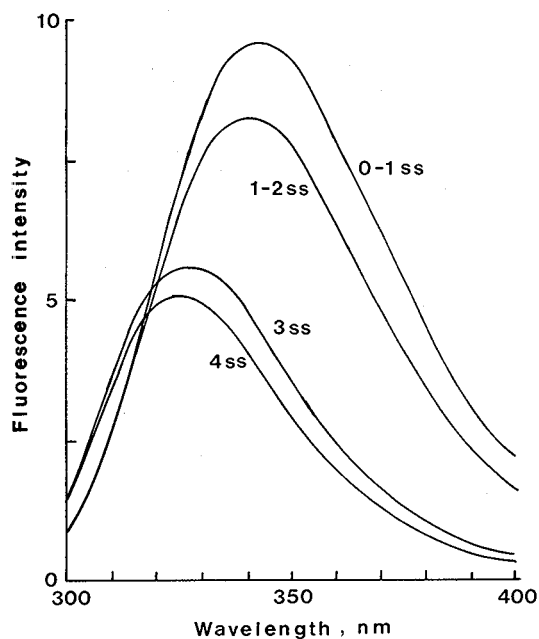
CDスペクトルから二次構造含量を計算した値を表1に示した。4SS α -LAと3SS α -LAの二次構造含量にはほとんど差が見られなかった。1-2SS α -LAでは不規則構造にはほとんど変化が見られないものの, α -ヘリックス含量が大きく減少し, それに相当する分が β -構造の増加となっている。0-1SS α -LAにおいては α -ヘリックス

Table 1 Secondary structure of modified α -lactalbumins

α - lactalbumin	% secondary structure			
	α -helix	β -sheet	turns	aperiodic
4SS	26.1	27.3	10.1	36.6
3SS	25.0	26.1	11.7	37.1
1-2SS	9.1	40.2	16.3	34.4
0-1SS	5.1	49.5	10.3	34.7

Fig.7 CD spectra of the modified α -LA

(○), 4SS α -LA; (●), 3SS α -LA;
(▲), 1-2SS α -LA; (■), 0-1SS α -LA

Fig.8 Fluorescence spectra of the modified α -LA.

Each sample was excited at 280nm

含量がさらに減少し、 β -構造が増加している。

牛血清アルブミンにおいては、加熱ゲル形成過程において β -構造が形成されるということが赤外吸収、ラマンおよびCDスペクトル分析によって確認されている⁽¹⁸⁻²⁰⁾。それゆえ、ここで得られた1-2SS α -LAや0-1SS α -LAは分子構造がはぐれた、会合しやすい構造に変化していると推定される。

α -LAには分子量が小さい割には多くの芳香族アミノ酸が存在し（チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン各4個）、生の状態ではこれらの芳香環側鎖は分子内部に埋もれている^(13,16)。芳香環が内部の疎水的環境から表面の親水的環境に移行することによって蛍光強度が増大し、蛍光ピークが長波長側にシフトすることが知られている⁽²¹⁾。そこで、トリプトファンの蛍光を測定することにより修飾 α -LAの芳香族アミノ酸の存在状況の変化を調べるために行った各修飾 α -LAの蛍光スペクトルの結果を図8に示した。

3SS α -LAは4SS α -LAよりも若干蛍光強度が増加し、ピークがわずかに長波長側にシフトした。二次構造含量には変化が認められない（表1）ので、この蛍光スペクトルの若干の変化は疎水的領域の表面への露出ではなく、むしろ分子内部の若干の広がりに対応するものであると考えられる。

1-2SS α -LAは蛍光強度が大きく増大し、ピークが著しく長波長側にシフトした。したがって、1-2SS α -LAでは分子内部の疎水的領域が大きく表面に露出していると考ええる。しかしながら、0-1SS α -LAに比べると蛍光強度は低いので、いくらかの疎水的領域を内部に残していると考えられる。

蛋白質の構造変化により特異抗体との結合性が変化することはよく知られており、抗体が蛋白質の分子構造変化を調べるためのプローブとして用いられるようになった⁽²²⁾。4SSと3SS α -LAの表面構造は同じであると考えられるので、3SS α -LAに対する特異抗体を用いて各修飾 α -LAの競合ELISAを行った結果を図9に示した。

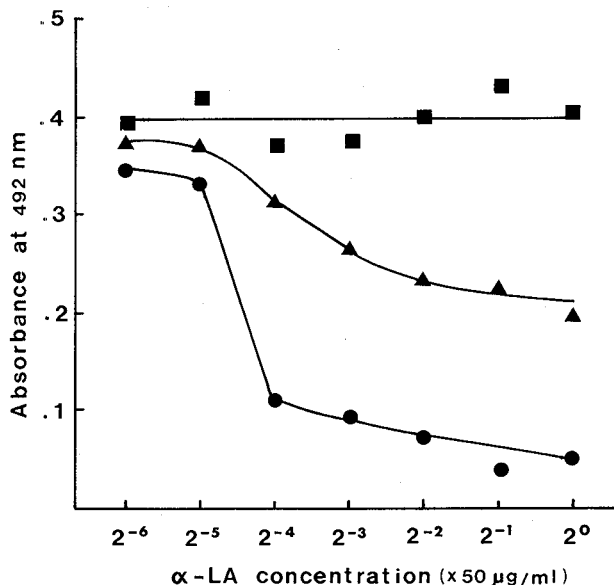


Fig.9 Inhibition of anti-3SS α -LA (1/10,000 dilution) by modified α -LA according to the ELISA assay

(●), 4SS α -LA; (▲), 1-2SS α -LA; (■), 0-1SS α -LA

4 SS, 3 SS α -LAいずれの場合にもおよそ $5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で抗体を中和した (3 SS α -LAの結果は省略した)。一方, 0-1 SS α -LAはかなりの高濃度においても抗体を中和せず, 抗体との結合能が完全に消失していると考えられる。1-2 SS α -LAでは $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度においてはほぼ半分の抗体を中和し, 分子表面に抗体結合部位がある程度残っていることを示した。本実験ではポリクローナル抗体を用いているため, 残存する抗体結合位置を特定出来ないで, 今後, モノクローナル抗体を用いてその位置の決定を行う必要がある。

競合ELISAの結果より, 3 SS α -LAは分子の表面構造には変化がなかったが, 0-1 SS α -LAは分子構造が大きく変化したと考えられる。また, 1-2 SS α -LAでは表面構造に変化が見られたものの若干のものと構造を保持していると考えられる。

溶解度の変化

図10に 4 SS, 3 SSおよび 1-2 SS α -LAの種々のpHにおける溶解度を示した。4 SSおよび 3 SS α -LAはいずれのpHにおいても高い溶解度を示した。一方, 1-2 SS α -LAはpH4.2からpH5.5の範囲にかけて溶解度の著しい低下が見られた。図には示していないが, 0-1 SS α -LAも 1-2 SS α -LAとほとんど同じ溶解度パターンを示した。

蛋白質の溶解度は主に正味荷電 (ゼータポテンシャルで表される) と表面疎水性 (分子表面に露出した疎水性領域の大きさに相当) によって支配され, 疎水性が高いほど, ゼータポテンシャルがゼロにちかいほど溶解度が低くなると報告されている⁽²³⁾。また, ゲル形成につながる分子間凝集反応において β -構造の増加が見られることが報告されている⁽¹⁸⁻²⁰⁾。

4 SS, 3 SS α -LAの場合には表面に疎水性領域が露出していないためにゼータポテンシャルがゼロになるpH 4.8付近のpHにおいても高い溶解度を維持しているが, 1-2 SS α -LAでは分子構造の変化により β -構造含量が増加し, かなりの量の疎水性領域が表面に露出するためにpH4.8付近において溶解度が著しく低下すると考えられた。

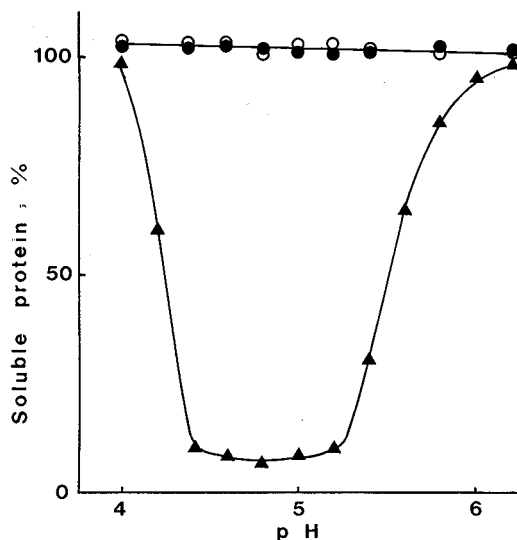


Fig 10. Solubility profiles of the modified α -LA.

(○), 4SS α -LA; (●), 3SS α -LA;

(▲), 1-2SS α -LA.

以上の結果より、 α -LAの4本の分子内SS結合のうち2本以上が切断されることにより α -LAの立体構造および表面構造が大きく変化し、そのために等電点付近における溶解度が著しく低下したと結論された。

文 献

- (1) KINSELLA, J. E.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **7**, 219 (1976).
- (2) 浜口浩三：改訂蛋白質機能の分子論, 111-148, 学会出版センター (1990).
- (3) PERRY, J. L. and WEITZEL, R.: *Science*, **226**, 555 (1984).
- (4) TANIYAMA, Y., YAMAMOTO, Y., NAKAO, M., KIKUCHI, M. and IKEHARA, M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **152**, 962 (1988).
- (5) HARRIS, T. J. R.: *Genetic Engineering*, 126 ed. by WILLIAMSON, R., Academic Press (1983).
- (6) LINDAHL, L. and VOGEL, H.: *Anal. Biochem.* **140**, 394 (1984).
- (7) KRONMAN, M. J. and ANDREOTTI, R. E.: *Biochemistry*, **3**, 1145 (1964).
- (8) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (9) HABEEB, A. F. S. A.: *Method in Enzymology*, **25**, 457 (1972).
- (10) CREIGHTON, T. E.: *Nature*, **284**, 487 (1980).
- (11) CHANG, C. T., WU, C. S. C. and YANG, J. T.: *Anal. Biochem.*, **91**, 13 (1978).
- (12) ENGVALL, E. and PERLMAN, P.: *Immunochemistry*, **8**, 871 (1971).
- (13) BREW, K., CASTELLINO, F. J., VANAMAN, T. C. and HILL, R. L.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 4570 (1970).
- (14) SHECHTER, Y., PATCHORNIK, A. and BURSTEIN Y.: *Biochemistry*, **12**, 3407 (1973).
- (15) HIRAOKA, Y., SEGAWA, T., KUWAJIMA, K., SUGAI, S. and MURAI, N.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**, 1098 (1980).
- (16) KOGA, K. and BERLINER, L. J.: *Biochemistry*, **24**, 7257 (1985).
- (17) KUWAJIMA, K., IKEGUCHI, M., SUGAWARA, T., HIRAOKA, Y. and SUGAI, S.: *Biochemistry*, **29**, 8240 (1990).
- (18) CLARK, A. H., SAUNDERSON, D. H. P. and SUGGETT, A.: *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 353 (1981).
- (19) YASUDA, K., NAKAMURA, R. and HAYAKAWA, S.: *J. Food Sci.*, **51**, 1289 (1986).
- (20) WANG, C-H and DAMODARAN, S.: *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 433 (1991).
- (21) JANOLINO, V. G., SLIWKOWSKI, M. X., SWAISGOD, H. E. and HORTON, R. H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 269 (1978).
- (22) KAMINOGAWA, S., SHIMIZU, M., AMETANI, A., HATTORI, M., ANDO, O., HACHIMURA, S., NAKAMURA, Y., TOTSUKA, M. and YAMAUCHI, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **998**, 50 (1989).
- (23) HAYAKAWA, S. and NAKAI, S.: *J. Food Sci.*, **50**, 486 (1985).

(1991年5月31日受理)