

報 文

環形動物 (ヒトツモンミズ *Pheretima hilgendorfi*) の
中性スフィンゴ糖脂質の単離と同定杉田 陸海*・早田知恵子*・鈴木 實**・竹田 忠紘***
水野間智子*・牧野 具加*・成島 謙司*・堀 太郎****

*滋賀大学教育学部化学教室 (〒520 大津市平津2-5-1)

**東京都臨床医学総合研究所生体膜教室 (〒113 文京区本駒込3-18-22)

***名古屋市立大学薬学部生薬学教室 (〒467 名古屋市瑞穂区田辺通3-1)

****滋賀文化短期大学 (〒527 八日市市布施町29)

Isolation and Characterization of Neutral Glycosphingolipids
from Annelida (Earthworm, *Pheretima hilgendorfi*)Mutumi SUGITA*, Chieko HAYATA*, Minoru SUZUKI**, Tadahiro TAKEDA***,
Tomoko MIZUNOMA*, Tomoka MAKINO*, Kenji NARUSHIMA*, and Taro HORI*****Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University
(2-5-1, Hiratsu, Otsu-shi, 〒520)**Department of Membrane Biochemistry, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science
(3-18-22, Honkomagome, Bunkyo-ku, 〒113)***Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University
(3-1, Tanabe-Dori, Mizuho-ku, Nagoya-shi, 〒467)

****Shiga Junior College of Cultural Studies and Technology (29, Fuse, Yokaichi-shi, 〒527)

A series of glycosphingolipids containing galactose was purified from the earthworm, *Pheretima hilgendorfi* by DEAE- and QAE-Sephadex, Florisil, and Iatrobeds column chromatography. From structural studies including compositional sugar analysis, methylation analysis, chromium trioxide oxidation, enzymatic hydrolysis, ^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopy, and fast atom bombardment mass spectrometry, their structures were determined to be as follows: Gal β 1-Cer, Gal β 1-6 Gal β 1-Cer, and Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal β 1-Cer.

The ceramide moiety was composed of octadecaspingene and its branched homologue as the main sphingoids, and saturated C_{22} -, C_{23} -, and C_{24} -acid as the major fatty acids.

Thin-layer chromatography and the results of sugar analysis indicated the structures of two minor components of the ceramide mono- and trihexoside fractions to be Glc-Cer and Man-Gal-Gal-Cer, respectively.

1 緒 言

我々は今までに二等動物の複合糖脂質の系統的研究において、前口動物である軟体動物(二枚貝類)^{1)~4)}及び節足動物(昆虫類・甲殻類)^{5)~7)}にマンノースを糖鎖中に含有する脂質群(マンノ脂質と仮称)を見だし、それらの化学構造を明らかにしている。さらに、この免疫化学的研究によって、動物界におけるこれらのマンノ脂

連絡者: 杉田陸海

質の分布域を調べる一方、細胞内における局在性についても観察して報告してきた^{8)~10)}。

その結果、前口動物では、上述のマンノ脂質のほか巻貝類(軟体動物)¹¹⁾や条虫類(扁形動物)¹²⁾にはガラクトースのみから成っているガラクト脂質の両者が分布するようである。

今回、前口動物におけるマンノ及びガラクト脂質の分布域を明確にする目的で、環形動物のヒトツモンミズ *Pheretima hilgendorfi* の中性糖脂質を精査した。

2 実 験

2.1 中性糖脂質画分の調製

ヒトツモンミズは環形動物門、貧毛類、太ミズ科、太ミズ属に属している。250 gの乾燥したヒトツモンミズ(動物性と藻類、地龍として薬局で市販されているものを購入)を細粉碎した後、3 Lのクロロホルム-メタノール(2:1, vol/vol)及び6 Lのクロロホルム-メタノール(1:1, vol/vol)で抽出を行った。この抽出物を弱アルカリ加水分解処理した後、アセトン粉末として7.7 gを得た(乾燥重量当たり3.1%)。このうちの約1.5 gを用いて、既に確立している貝類及び昆虫類糖脂質の系統的分離法に準じてDEAE-及びQAE-セファデックスカラムクロマトグラフィーを行って、中性脂質画分、酸性脂質画分、極性脂質画分に分画した^{3),4)}。さらに、これらの3画分中の中性脂質画分をアセチル化し、フロリシルカラムで分画後、脱アセチル化して中性糖脂質画分を得た¹³⁾。

2.2 中性糖脂質画分のケイ酸(Iatrobeds)カラムクロマトグラフィーによる分画

中性糖脂質画分をIatrobeds(6 RS-8060, ヤトロン社製)カラムクロマトグラフィー(1.5×60 cm)によってクロロホルム-メタノール-水(80:20:1, vol/vol/vol, 480 mL~50:50:5, 500 mL)の濃度勾配溶出法で分画し、セラミドモノ(CMS), ジ(CDS)及びトリサッカリド(CTS)画分を得た。

2.3 薄層クロマトグラフィー(TLC)

薄層プレートはMerck社製のSilica gel 60を用いた。展開剤はクロロホルム-メタノール-水(60:40:10, vol/vol/vol)及び2-プロパノール-水-アンモニア(75:15:5, 75:40:5, vol/vol/vol)を使用し、展開後の発色はオルシノール-硫酸試薬(糖), Dittmer試薬(リン)¹⁴⁾, ニンヒドリン試薬(アミノ基), ローダミン6 G試薬(脂質)によった。

2.4 ガスクロマトグラフィー(GLC)

糖組成はTMS-メチルグリコシド, 脂肪酸組成はメチルエステル, 長鎖塩基組成はTMS-誘導体として, また, 糖鎖の結合位置は部分メチル化アルジトールアセテート(CiucanuとKerekの粉末NaOH法¹⁵⁾によりメチル化)としてそれぞれGLC分析した。分析はすべてShimadzu GC-9Aで行い, カラムは0.2 mm×25 mの0.25 µm 5%フェニルメチルシリコン化学結合型シリカキャピラリー(島津HiCap-CBP 5)を使用した。分析温度はそれぞれ次のように設定した。糖(160→200°C, 2°C/min), 脂肪酸(180→240°C, 2°C/min), 長鎖塩基(200→230°C, 2°C/min), 部分メチル化アルジトールアセテート(200°C)。

2.5 β-ガラクトシダーゼによる加水分解

2.5.1 *Escherichia coli* のβ-ガラクトシダーゼ

10~15 µgの試料を100 µgのタウロデオキシコール酸ナトリウムを含む50 mMクエン酸緩衝液(pH 6.6)50 µLに溶かし, 50 µLの同緩衝液で希釈した75 Uの*E. coli*由来のβ-ガラクトシダーゼ(ベリンガー・マンハイム山之内, 1500 U/mL)を加えて, 37°Cで反応させた。反応後, 50 µLのクロロホルム-メタノール(2:1, vol/vol)を加えて二層に分配した。下層を濃縮した後, 少量のクロロホルム-メタノール(2:1)に溶解してTLC分析を行った。

2.5.2 *Canavalia ensiformis* のβ-ガラクトシダーゼ

50 mMクエン酸緩衝液(pH 3.5)及びナタマメ*C. ensiformis*由来のβ-ガラクトシダーゼ(生化学工業, 5 U/250 µL)以外は上述の2.5.1に準じた。

2.6 機器による分析

2.6.1 ¹H-NMR及び¹³C-NMR分析

JEOL GSX-400 MHz NMRスペクトロメーターにより, 溶媒としてDMSO-*d*₆と重水の混合溶媒(90:10, vol/vol)を用い, 60°Cで測定した。化学シフトの内部標準にはテトラメチルシランを使用した。

2.6.2 陰イオンFAB-MS分析

JEOL HX-110 MSスペクトロメーター/DA 5000コンピュータシステムにより行った。マトリックスとしてトリエタノールアミンを用い, 加速電圧8.0 kV, 一次粒子(Xe⁰)6.0 kVで測定した。

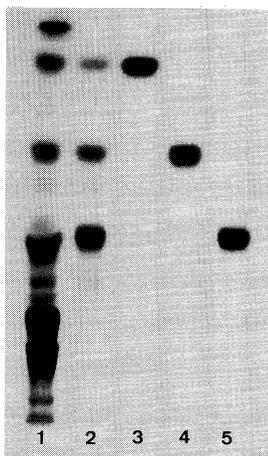
3 結果及び考察

3.1 ヒトツモンミズの糖脂質

ヒトツモンミズの弱アルカリ処理に安定な脂質画分のTLCをFig.-1(lane 1)に示したが, オルシノール-硫酸試薬に陽性反応を示す多数の脂質の存在が認められた。本実験では, 比較的糖鎖の短い中性糖脂質の分析に主眼を置いたので, DEAE-及びQAE-セファデックスによって得た中性脂質画分を, さらにアセチル化してフロリシルで分画し, ジクロロエタン-アセトン(1:1, vol/vol)溶出画分を用いた。この画分を脱アセチル化した後のTLCには4~5本のバンドが認められたが, 糖鎖の長いものは混在していなかった(Fig.-1, lane 2)。

3.2 糖鎖の短い中性糖脂質の単離

フロリシル分画後の脱アセチル化糖脂質画分に含まれる比較的含有量が多いと予想された3種の糖脂質の精製を行うため, Iatrobedsを用いて濃度勾配溶出法によって分画した。クロロホルム-メタノール-水(60:40:10, vol/vol/vol)の中性系展開剤を用いたTLC上でそれぞれ単一のバンドを示す溶出画分を分取し, 移動度の大きい順にCMS(3 mg), CDS(8 mg)及びCTS



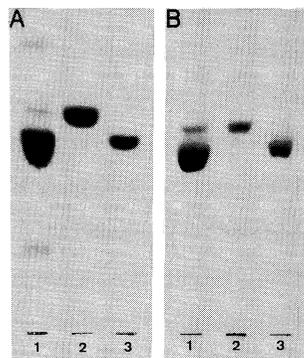
Lane 1, alkali-stable lipid fraction of earthworm ; lane 2, neutral glycosphingolipid fraction prepared by the method of Saito and Hakomori¹³⁾ ; lane 3, ceramide monosaccharide (CMS) fraction ; lane 4, ceramide disaccharide (CDS) fraction ; lane 5, ceramide trisaccharide (CTS) fraction. The separation was shown on a TLC glass plate of silica gel 60 (E. Merck) developed in chloroform-methanol-water (60 : 40 : 10, vol/vol/vol), and the spots were visualized with orcinol-H₂SO₄ reagent.

Fig.-1 Thin layer chromatogram of neutral glycolipids, ceramide mono-, di- and trisaccharide fractions obtained from earthworm, *Pheretima hilgendorfi*, which were fractionated by silicic acid (Iatrobeds) column chromatography.

(15 mg) 画分とした (**Fig.-1**, lanes 3,4,5)。このようにして得られた3画分を、さらに塩基性系展開剤 (2-プロパノール-水-アンモニア) を用いて調べたところ、CDS 画分は単一のバンドを示したが、CMS 及び CTS 画分は両者共に複数のバンドに分離し、それぞれ混合物であることが判明した (**Fig.-2**)。そこで TLC に使用した塩基性展開剤を溶出溶媒とした Iatrobeds カラムクロマトグラフィーを行って、それぞれを単離し、TLC 上の移動度の大きい順に CMS 画分については、CMS₁ 及び CMS₂ (**Fig.-2**, A)、一方、CTS 画分は CTS₁ 及び CTS₂ (**Fig.-2**, B) とした。しかし、単離した CMS₁ と CTS₁ はいずれも極めて微量なため、構成糖分析のみ行った (後述)。

3.3 CMS₂, CDS 及び CTS₂ の構造

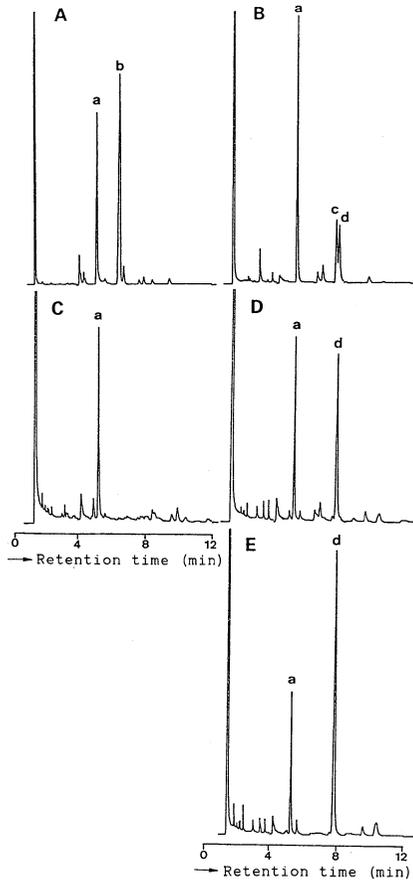
単離した CMS₂, CDS, CTS₂ の構成糖は GLC 分析の結果、いずれもガラクトースが検出されることから、ガラクト脂質系列で、TLC の移動度から判断してそれぞれモノ、ジ及びトリガラクトシルセラミドと推定し



A, lane 1: CMS fraction ; lane 2: isolated CMS₁ ; lane 3: isolated CMS₂ ; B, lane 1: CTS fraction ; lane 2: isolated CTS₁ ; lane 3: isolated CTS₂. The spots were visualized with orcinol-H₂SO₄ reagent after developing in 2-propanol-water-ammonia (75 : 15 : 5, vol/vol/vol for Plate A and 75 : 40 : 5 for Plate B).

Fig.-2 Thin layer chromatograms of ceramide mono- and trisaccharides purified by silicic acid column chromatography using 2-propanol-water-ammonia systems as the eluting solvents.

た。糖鎖の結合位置は標準のジガラクトシド (Gal_p 1→4 Gal_p 及び Gal_p 1→Gal_{p,f}, Sigma 社製) の部分メチル化アルジトールアセテートの GLC の保持時間との比較から決定した。すなわち、CMS₂ からは 1,5-ジ (O-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (O-メチル) ガラクチトール (1-Gal) のみ、CDS からは 1-Gal と 1,5,6-トリ (O-アセチル)-2,3,4-トリ (O-メチル) ガラクチトール (1,6-Gal) が 1 : 1 (モル比)、CTS₂ からは 1-Gal と 1,6-Gal が 1 : 2 (モル比) を同定し、糖鎖はすべて 1→6 結合であることがわかった (**Fig.-3**)。アノマー配置の決定は *E. coli* 及びナタマメ由来の β-ガラクトシダーゼによる酵素的な方法、クロム酸々化法¹⁶⁾、¹H-NMR 及び ¹³C-NMR 分析法によって行った。**Fig.-4** に CDS 及び CTS₂ の β-ガラクトシダーゼによる加水分解の結果を示したが、CDS は反応時間の経過に伴って CMS を生じ、さらに分解された。また、CTS₂ は反応時間の経過と共に CMS へと分解が進むが、分解の中間成績体である CDS は微量しか検出されなかった。本実験に用いた酵素はジガラクトシドに極めて特異性の高いものであろうと思われた。一方、クロム酸による酸化では、CMS₂, CDS, CTS₂ からのガラクトースの回収は皆無であり、アノマー配置はすべて β-結合であることが推測できた。さらに **Fig.-5** に CTS₂ の ¹H-NMR 分析結果を示したが、化学シフト (δ: ppm) 及びスピン結合定数 (d, J: Hz) は δ: 4.238 (d, J: 9.32), 4.221 (d, J: 7.33), 4.160 (d, J: 5.83) で 3 個のガラクトー

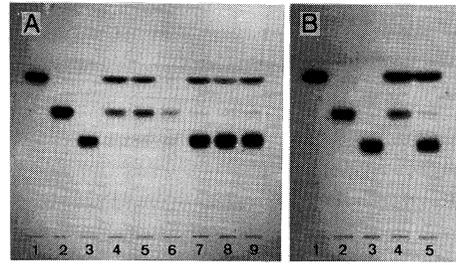


A and B, Gal_p1→4 Gal_p and Gal_p1→6 Gal_{p,f}, as authentic disaccharide standards; C, CMS₂; D, CDS; E, CTS₂; a, 1,5-di(*O*-acetyl)-2,3,4,6-tetra(*O*-methyl) galactitol; b, 1,4,5-tri(*O*-acetyl)-2,3,6-tri(*O*-methyl)galactitol; c, 1,4,6-tri(*O*-acetyl)-2,3,5-tri(*O*-methyl)galactitol; d, 1,5,6-tri(*O*-acetyl)-2,3,4-tri(*O*-methyl) galactitol.
 Fig.-3 Gas chromatograms of partially methylated alditol acetates.

スはずべてβ-結合であることがわかった。また、スペクトルは示していないが、CTS₂の¹³C-NMR分析結果からアノマー炭素はC-1, δ: 104.05; C-1', C-1'', δ: 103.51にβ-結合に基づくシグナルが、さらに、C-6, δ: 68.09; C-6, δ: 68.10; C-6'', δ: 60.63に認められることから、それぞれβ1→6結合が示唆された。

以上の結果からCMS₂, CDS, CTS₂の構造を次のように推定した。CMS₂, Gal β1-1 Cer; CDS, Gal β1-6 Gal β1-1 Cer; CTS₂, Gal β1-6 Gal β1-6 Gal β1-1 Cer.

3.4 CMS₁及びCTS₁の構成糖分析



A, β-galactosidase from *E. coli*; lanes 1 to 3: isolated CMS₂, CDS and CTS₂; lanes 4 to 6: CDS incubated for 3 h, 6 h, and 12 h; lanes 7 to 9: CTS₂ incubated for 3 h, 6 h and 12 h; B, β-galactosidase from jack bean; lanes 1 to 3: isolated CMS₂, CDS and CTS₂; lane 4: CDS incubated for 18 h; lane 5: CTS₂ incubated for 18 h. TLC conditions were the same as described in Fig.-1.

Fig.-4 Thin layer chromatograms of the reaction products from CDS and CTS₂ by treatment with two kinds of β-galactosidases.

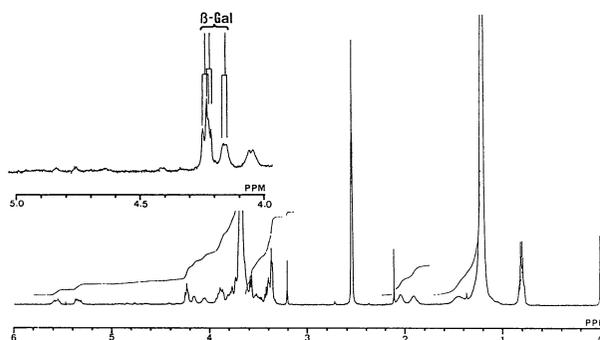
CMS及びCTS画分から塩基性溶媒系のカラムクロマトグラフィーで単離したCMS₁とCTS₁は、いずれも極めて微量だったので、GLCによる構成糖分析のみを行った。CMS₁からはグルコースを、CTS₁からはガラクトースとマンノース(2:1,モル比)を同定した。CMS₁はグルコセレブロシドと考えられるが、CTS₁はナタメ由来のα-マンノシダーゼ(ベーリンガー・マンハイム山之内)で処理したところCDSを生じたので、現在のところ糖の配列はMan-Gal-Gal-Cerと推定している。ミミズのセレブロシドについては、Okumuraら¹⁷⁾によって神経系にグルコセレブロシドの存在することが報告されている。しかし、ガラクトセレブロシドが見いだされないところから、グルコセレブロシドは神経系に局在するものと考えられる。なお、マンノースを含有した新しいタイプのガラクト脂質(CTS₁)については、構造決定のため研究を続行中である。

3.5 CMS₂, CDS, CTS₂の脂肪酸及び長鎖塩基成分

CMS₂, CDS, CTS₂のセラミド成分の同定は、脂肪酸及び長鎖塩基共にGLC分析による。それらの結果をTable-1に示したが、3者共に脂肪酸はC_{22,23,24}の飽和酸が、長鎖塩基はC₁₈-スフィンゲニンとその分枝鎖のものが主成分であった。このことから、CMS₂, CDS, CTS₂は同一経路によって生成されることが示唆された。

3.6 CMS₂, CDS, CTS₂の陰イオンFABマスペクトル

CMS₂, CDS, CTS₂の陰イオンFABマスペクトルをFig.-6に示したが、これらのスペクトルのいずれから3種類の異なった分子種([M-H]⁻), CMS₂: m/z

Fig.-5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of CTS_2 .Table-1 Chemical composition of the ceramide portions of CMS_2 , CDS and CTS_2 .

Fatty acid ^a	CMS_2	CDS	CTS_2
16 : 0	0.4	0.2	0.2
18 : 0	2.0	1.5	1.0
19 : 0	0.4	0.2	0.7
20 : 0	3.3	3.6	4.3
21 : 0	2.5	1.0	1.5
22 : 0	48.2	47.8	46.9
23 : 0	11.7	10.5	11.4
24 : 0	31.5	35.2	34.0
Sphingoid ^a	CMS_2	CDS	CTS_2
br ^b 18 : 1	36.6	18.8	12.6
18 : 1	44.4	77.0	82.7
br ^b 18 : 1	19.0	4.2	4.7

a Expressed as percentage of total fatty acids and sphingoids.

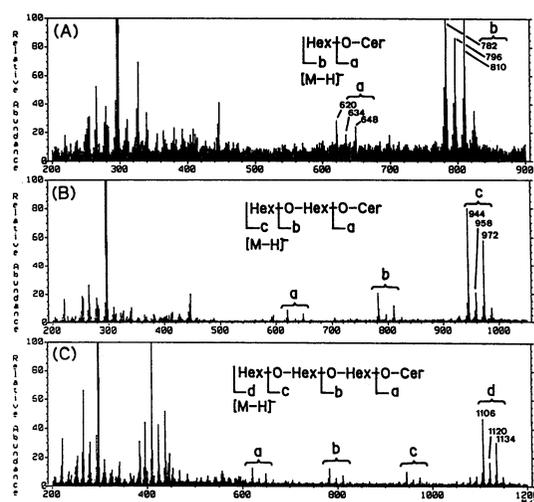
Chain length : number of double bonds.

b Branched sphingoid.

782, 796, 810 ; CDS : m/z 944, 958, 972 ; CTS_2 : m/z 1106, 1120, 1134) の存在が認められた。これらの違いはフラグメントイオン m/z 620 ($\text{C}_{22}:0$ 脂肪酸- $\text{C}_{18}:1$, br- $\text{C}_{18}:1$ 長鎖塩基), 634 ($\text{C}_{23}:0$ - $\text{C}_{18}:1$, br- $\text{C}_{18}:1$), 648 ($\text{C}_{24}:0$ - $\text{C}_{18}:1$, br- $\text{C}_{18}:1$) から類推されるセラミドの分子種に起因するものと推測でき, Table-1 に示したセラミドの構成成分比とも一致した。

3.7 前口動物におけるマンノ脂質及びガラクト脂質両者の分布

セラミドジ及びトリサッカリドに注目して, 今までに調べられている前口動物におけるマンノ脂質 (Man-Glc-Cer, Man-Man-Glc-Cer, GlcNAc-Man-Glc-Cer) 及びガラクト脂質 (Gal-Gal-Cer, Gal-Gal-Gal-Cer) の分布を動物系統樹の一例¹⁸⁾ に従ってまとめたものを Fig.-7 に示した。それによると, 節足動物では昆虫類 (キンバエ幼虫)¹⁹⁾ 及び甲殻類 (南極

Fig.-6 Negative-ion FAB-MS spectra of CMS_2 (A), CDS (B) and CTS_2 (C).

オキアミ, テナガエビ)^{7), 10)} にマンノ脂質の Man β 1-4 Glc β 1-1 Cer, GlcNAc β 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-1 Cer が存在している。一方, 環形動物では, 今回, 初めて貧毛類 (ヒトツモンミズ) からガラクト脂質の Gal β 1-6 Gal β 1-1 Cer, Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal β 1-1 Cer が見いだされた。

軟体動物では斧足類 (イケチョウガイ, ハマグリなどの二枚貝類)^{2), 4)} や頭足類 (スルメイカ)²⁰⁾ にはマンノ脂質の Man β 1-4 Glc β 1-1 Cer, Man α 1-3 Man β 1-4 Glc β 1-1 Cer, Man α 1-4 Man β 1-4 Glc β 1-1 Cer が, また, 腹足類 (サザエなどの巻貝類)¹¹⁾ にはガラクト脂質の Gal β 1-6 Gal β 1-1 Cer, Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal β 1-1 Cer が存在している。扁形動物では, 条虫類 (ウズラジョウチュウ)¹²⁾ にガラクト脂質の Gal α 1-4 Gal-Cer, Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal-Cer, Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal β 1-6 Gal-Cer の存在が報告されている。

Protostomia(前口動物)

文 献

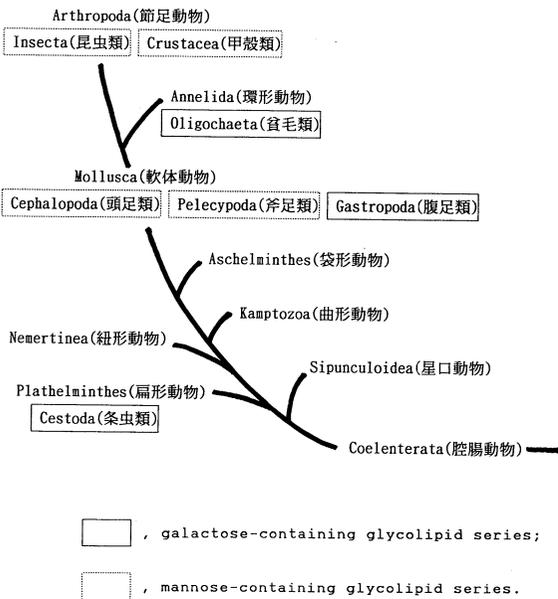


Fig.-7 Taxonomic distribution of galactose-containing glycolipid and mannose-containing glycolipid series in Protostomia.

4 ま と め

環形動物の貧毛類に属するヒトツモンミミズの中性糖脂質は、ガラクト脂質 (Gal β1-1 Cer, Gal β1-6 Gal β1-1 Cer 及び Gal β1-6 Gal β1-6 Gal β1-1 Cer)が主成分で、グルコセレブロシドやマンノースを含むガラクト脂質も微量ながら存在することを明らかにした。

今までに節足動物(昆虫類, 甲殻類)にはマンノ脂質, 軟体動物では二枚貝類にはマンノ脂質, 巻貝類にはガラクト脂質, 扁形動物(条虫)にはガラクト脂質の存在が報告されており, 今回, 初めて環形動物にガラクト脂質の存在を見いだしたことは, 比較生化学上極めて興味を引くところである。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金(重点領域研究 No. 02259103)によって行った。

なお、御助言を頂いた東京都臨床医学総合研究所の鈴木明身博士に深謝します。

[平成3年(1991年)11月26日受理]

- 1) T. Hori, M. Sugita, S. Ando, M. Kuwahara, K. Kumauchi, E. Sugie, O. Itasaka, *J. Biol. Chem.*, 256, 10979 (1981)
- 2) M. Sugita, T. Yamamoto, S. Masuda, O. Itasaka, T. Hori, *J. Biochem.*, 90, 1529 (1981)
- 3) T. Hori, M. Sugita, S. Ando, K. Tsukada, K. Shiota, M. Tsuzuki, O. Itasaka, *J. Biol. Chem.*, 258, 2239 (1983)
- 4) M. Sugita, H. Nakae, T. Yamamura, Y. Takamiya, O. Itasaka, T. Hori, *J. Biochem.*, 98, 27 (1985)
- 5) M. Sugita, S. Itonori, F. Inagaki, T. Hori, *J. Biol. Chem.*, 264, 15028 (1989)
- 6) M. Sugita, F. Inagaki, H. Naito, T. Hori, *J. Biochem.*, 107, 899 (1990)
- 7) 杉田陸海, 糸乗 前, 前川浩也, 孫工尚久, 板坂 修, 堀 太郎, *脂質生化学研究*, 32, 35 (1990)
- 8) M. Sugita, T. Inoue, O. Itasaka, T. Hori, *J. Biochem.*, 95, 737 (1984)
- 9) M. Sugita, Y. Sanai, S. Itonori, T. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, 962, 159 (1988)
- 10) S. Itonori, M. Hiratsuka, N. Sonku, H. Tsuji, O. Itasaka, T. Hori, M. Sugita, *Biochim. Biophys. Acta*, 1123, 263 (1992)
- 11) T. Matsubara, A. Hayashi, *J. Biochem.*, 89, 645 (1981)
- 12) K. Nishimura, A. Suzuki, H. Kino, *Biochim. Biophys. Acta*, 1086, 141 (1991)
- 13) T. Saito, S. Hakomori, *J. Lipid Res.*, 12, 257 (1971)
- 14) J.C. Dittmer, R.L. Lester, *J. Lipid Res.*, 5, 126 (1964)
- 15) I. Ciucanu, F. Kerek, *Carbohydr. Res.*, 131, 209 (1984)
- 16) O. Itasaka, M. Sugita, H. Yoshizaki, T. Hori, *J. Biochem.*, 80, 935 (1976)
- 17) N. Okamura, M. Stoskopf, F. Hendricks, Y. Kishimoto, *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 82, 6779(1985)
- 18) 日本生化学会編, “生化学データブック I” 東京化学同人(1979) p. 1849
- 19) M. Sugita, M. Nishida, T. Hori, *J. Biochem.*, 92, 327 (1982)
- 20) 板坂 修, 杉田陸海, 堀内理江, 吉田幸子, 伊藤将弘, 木谷ひとみ, 堀 太郎, *滋賀大学教育学部紀要*, 41, 43 (1991)