海水ビブリオVibrio sp.C-51のアデノシンアミノヒドロラーゼ

誌名	日本大學農獸医學部學術研究報告
ISSN	00780839
著者名	加藤,順 高井,義之 酒井,宏治
発行元	日本大学農獣医学会
巻/号	54号
掲載ページ	p. 63-71
発行年月	1997年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., No. 54, 63－71 (1997)

Adenosine Aminohydrolase from a Marine Vibrio

Jun KATO, Yoshiyuki TAKAI, Koji SAKAI, Yumi KASAI, Jun OGIHARA and Kunio OISHI

Lab. of Microbiological Chemistry, Coll. Bio. Sci., 3-34-1 Shimouma, Setagaya-ku, Tokyo 154

(Accepted Nov. 21, 1996)

Abstract: An intracellular adenosine aminohydrolase was purifide from *Vibrio* sp. C-51 which was isolated from coastal water of Izu peninsula in April, 1989 and has stocked in our laboratory. This enzyme consists of a single peptide with a molecular weight of ca. 30,000 Da. It shows the optimal pH of 7.5 and the optomal temperature of 37℃ for deamination of adenosine, and is inhibited by 1 mM of Cu^{2+} and Zn^{2+}. Km value for adenosine was estimated as 182 μM. Adenosine, 2′-deoxyadenosine, 2′-o-metyladenosine, adenosine 9-arabinoside, and formycin A were the good substrates of this enzyme, whereas 2-chloroadenosine and N^6-methyladenosine were the potent inhibitors against adenosine deamination. AMP, ADP, ATP, IMP, 5′-deoxyadenosine and dihydrozeatin riboside were neither the substrates nor the inhibitors, suggesting that these compounds do not or hardly bind to the catalytic site of this enzyme.

Key words: Marine Vibrio, Adenosine aminohydrolase

海水ビブリオ *Vibrio* sp. C-51 のアデノシンアミノヒドロラーゼ

加藤　順・高井義之・酒井宏治
笠井由美・荻原　淳・大石邦夫

日本大学生物資源科学部　微生物化学研究室

(1996年11月21日受理)

アデノシンアミノヒドロラーゼ (EC 3.5.4.4) はアデノシンを脱アミノしてイノシンを生成する酵素で，種々の生物のプリン代謝において重要な役割を担っている[1,2]。この酵素は両生類[3]，鳥類[4,5]，哺乳類[6-9]，の細胞から精製され，その特性が詳細に報告されている。ヒトでは，先天的な本酵素活性の欠損が重篤な免疫不全を引き起こす[10]。これは常染色体の劣性遺伝病で，遺伝子治療が可能な疾病として研究者の注目を集めている。

一方，種々の微生物でも本酵素が見い出されているが，微生物由来酵素の多くは不安定であるため，その性質の報告は限られている。タカジアスターゼから精製された *Aspergillus oryzae* の菌体外アデノシンアミノヒドロラーゼは，アデニンヌクレオチドも脱アミノする非特異的な酵素として知られている[11-14]。また，*Halobacterium cutirubrum*[15]，*Micrococcus sodonensis*[16]，*Escherichia coli*[17]，*Pseudomonus iodinum*[18]，*Azotobacter vinelandii*[19]，*Bacillus cereus*[20]，の酵素は，*in vitro* では活性を失い，失活を防ぐために種々の金属イオンやエチレングリコール，エタノールなどを共存させねばならない。最近，*Streptomyces* sp. J-845，*Klebsiella* sp. LF 1202 から安定性のあるアデノシンアミノヒドロラーゼが精製され，その性質が報告された[21,22]。

我々は，関東から中部にかけての太平洋沿岸の海水から328株の Vibrio を分離した。これら菌株すべてが，NAD^+ を分解する代謝系を持ち，なかでも，C-51 株ではその系で強力なアデノシンアミノヒドロラーゼが働いていることを見い出した[23]。本報では，海水ビブリオ *Vibrio* sp. C-51 の持つ本酵素の精製と性質について述べる。

材料と方法

1. 使用菌株

1989年に TCBS 培地を用いて伊豆半島沿岸海水から分離した *Vibrio* sp. C-51 を用いた。本菌は菌体外に与えた NAD^+ を速やかにニコチナマイドとヒポキサンチンにまで分解する。分解活性は菌体内にのみ見い出され，培養液からは検出されない。菌体破砕沈殿物中には NAD^+ からアデノシンを生成する代謝系が，上清にはアデノシンからヒポキサンチンを生成する代謝系が存在する[23]。

2. 培　養

3％ Bacto-peptone (Difco Labs.), 0.5% Yeast extract（オリエンタル酵母），3％ NaCl からなる培地に上記菌を接種，30℃，15時間，振とう培養した。

3. アデノシンアミノヒドロラーゼ活性の測定

反応液（1 m*l*）は 44 μM アデノシン，50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.5），および酵素液からなる。37℃，30分反応後，A 265 の減少を測定した。活性 1 U は，1 分間に 1.0 μmole のイノシンを生成する強さとした。

4. 基質特異性の測定

基質特異性は，以下の 2 つの方法のいずれかにより調べた。1 つは CHANEY and MARBACH の方法[24] により，生成するアンモニアを測定するものである。反応液（0.2 m*l*）は 2.5 mM 基質，50 mM リン酸バッファー（pH 7.4）と酵素液を含む。酵素の添加によって反応を開始し，10分間反応後，phenol-hyphochlorite 試薬の添加により停止させた。もう 1 つの方法は，アミノ基を持たない基質の場合に用いる。30 μl の酵素溶液を等量の 2 mM 基質/50 mM リン酸バッファー（pH 7.4）と混合し，37℃，20分反応させる。反応液 3 μl をセルロースプレートにスポットし，水で展開後，UV 254 nm の吸収を観察する。

3. アデノシンアミノヒドロラーゼの精製

以下の手順で行った。すべての操作は 4 ℃以下で行った。

(1) 粗抽出液の調製

培養液を 8,500×g，10分遠心し，菌体を分離する。3％ NaCl/50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）で洗浄後 50 mM Tris-HC バッファー（pH 7.4）に懸濁し，フレンチプレス（1,500 kgf/cm^2）で破砕した。破砕液を 21,000×g，20分遠心して沈殿物を除き，粗抽出液を得た。

(2) 硫安分画

粗抽出液に30％飽和となるよう $(NH_4)_2SO_4$ を加え，生じる沈殿を除き，さらに $(NH_4)_2SO_4$ を加えて100％飽和とし，得られる沈殿物を集め，50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）に対して透析した。

(3) DEAE Sepharose fast flow カラムクロマトグラフィー

上記透析液を 13,000×g，15分の遠心にかけて不溶物を除去後，50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）で平衡化した DEAE Sepharose fast flow (Pharmacia AB) カラム（2.6×40 cm）に添加した。NaCl の直線濃度勾配（0-0.7 M）によって溶出してくる活性画分を集めた。

(4) Butyl Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィー

活性画分に $(NH_4)_2SO_4$ を加えて30％飽和とし，これを30％飽和 $(NH_4)_2SO_4$/50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）で平衡化した Butyl Toyopearl 650 M (Tosoh Co. Ltd.) カラム（1.6×40 cm）に添加した。$(NH_4)_2SO_4$ の直線濃度勾配（30-0％飽和）によって溶出してくる活性画分をあつめ，50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）に対して透析した。

(5) Q Sepharose fast flow カラムクロマトグラフィー

上記透析液を 50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）で平衡化した Q Sepharose fast flow (Pharmacia AB) カラム（1.6×20 cm）に添加し，NaCl の直線濃度勾配（0-0.4 M）によって溶出した。活性画分を集め，Amicon YM10 (Grace Japan) で濃縮した。

(6) Superose 12 HR カラムクロマトグラフィー

上記濃縮液を 0.15 M NaCl/50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.4）で平衡化した Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia AB) に添加し，ゲルろ過を行った。活性画分を同様にして再クロマトを行った。

6. その他の分析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は，ゲル濃度14％，SDS 濃度0.1％で，LAEMMLI の方法[26] に従って行った。泳動後，Coomasie brilliant blue R250 を用いてタンパク質染色した。

分子量は ANDREWS らの方法[27] に準じて Superose 12 HR のデータから，また WEBER and OSBORN の方法[28] に準じて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から算出した。

タンパク量は，LOWRY らの方法[25] によって測定した。

7. 試　薬

用いた試薬はすべて市販特級，分析用グレードのものである。

実験結果

1. アデノシンアミノヒドロラーゼの精製

DEAE Sepharose, Butyl Toyopearl, Q Sepharose, Superose カラムクロマトの各プロファイルを Figs. 1～4 に示す。また，それらのデータをまとめて Table 1 に示す。本酵素は *Vibrio* sp. C-51 の菌体粗抽出液から8.1%の回収率で，約670倍の比活性にまで精製された。精製標品は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを示した（Fig. 5a)。

2. 分子量

Fig. 5 に示すように，本酵素の分子量は Superose 12 HR を用いるゲルろ過クロマトグラフィーで 28×10^3 Da，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 32×10^3 Da と算定された。

3. 酵素学的性質

(1) 酵素活性に対する pH の影響

クエン酸，酢酸，リン酸，Tris-HCl の各バッファーを用い，pH 4.0-9.0 の範囲で酵素活性に対する pH の影響を調べ Fig. 6 (A) に示した。至適 pH は7.5で，pH 6.0-9.0 の範囲で最大活性の75%以上の活性が得られた。

(2) 酵素活性にに対する温度の影響

反応液の pH を7.5とし，20-60℃の反応温度で，酵素活性に対する温度の影響を調べ Fig. 6 (B) に示した。至適温度は37℃で，25-45℃の範囲で最大活性の80%以上の活性が得られた。

本酵素は 50 mM Tris-HCl バッファー（pH 7.5）中，4 ℃で 1 ヶ月以上安定であった。

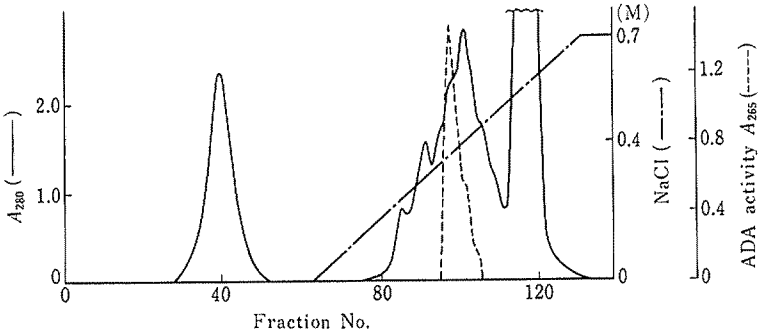

Fig. 1 Ion exchange chromatography of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51.
Column : DEAE Sepharose fast flow (2.6×40 cm).
Flow rate : 1 m*l*/min.
Fraction : 5 m*l*/tube.

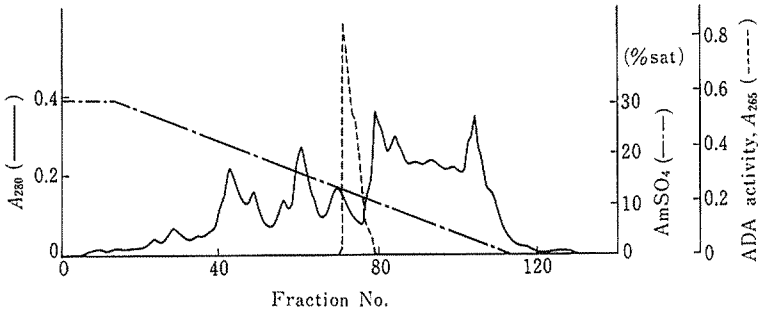

Fig. 2 Hydrophobic chromatography of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51.
Column : Butyl toyopearl 650 M (1.6×40 cm).
Flow rate : 1 m*l*/min.
Fraction : 4 m*l*/tube.

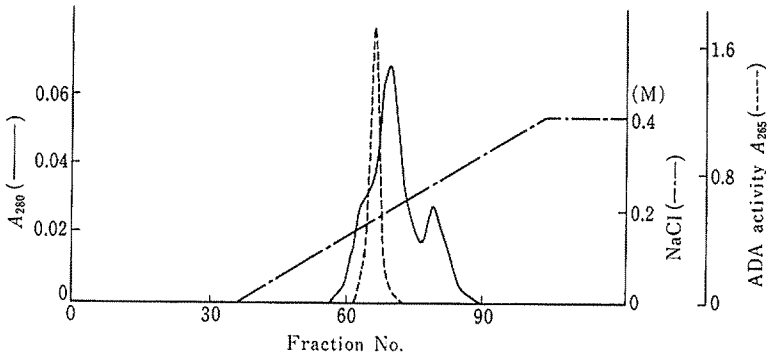

Fig. 3 Ion exchange chromatography of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51.
Column : Q Sepharose fast flow (1.6×20 cm).
Flow rate : 0.5 m*l*/min.
Fraction : 3 m*l*/tube.

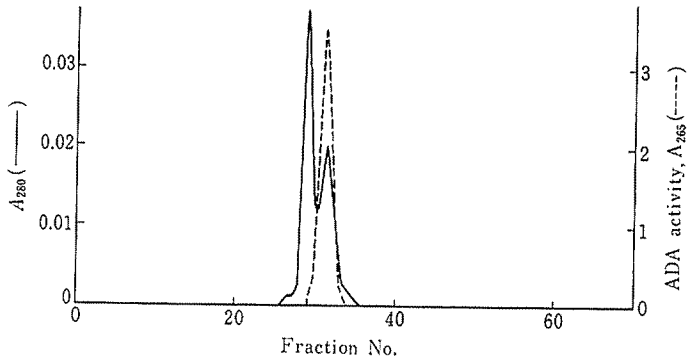

Fig. 4 Gel filtration chromatography of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51.
Column : Superose 12 HR 10/30.
Flow rate : 0.4 m*l*/min.
Fraction : 0.4 m*l*/tube.

Table 1 Summary of purification

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
Cell-free extract	3075	102.1	0.03(1.0)	100
30-100% sat $AmSO_4$ ppt	1364	61.9	0.05(1.4)	60.6
DEAE Sepharose Fast flow	187	29.8	0.16(4.8)	29.2
Butyl-toyopearl 650 M	12.8	15.2	1.18(35.7)	14.8
Q Sepharose Fast flow	1.3	10.4	7.90(230.1)	9.9
Superose 12 HR (FPLC)	0.4	8.3	22.32(673.9)	8.1

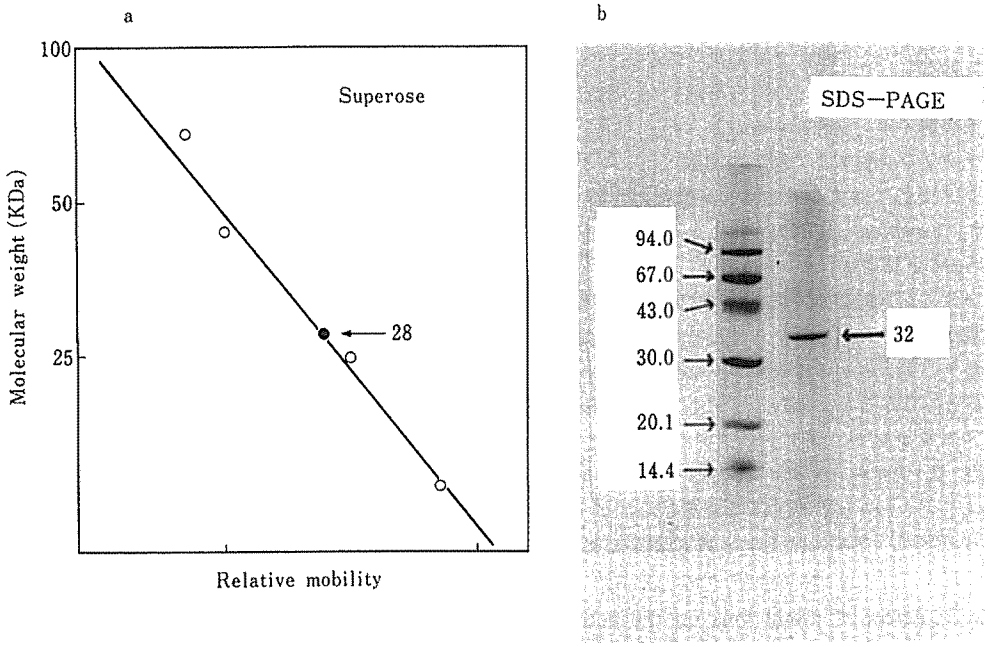

Fig. 5 Molecular weight determination of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51.

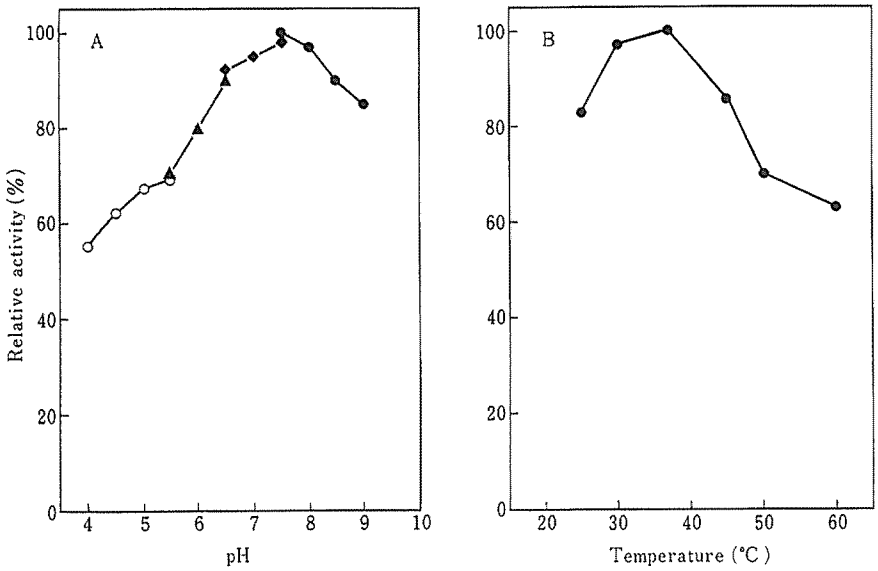

Fig. 6 Effects of pH and temperature on adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51.

(A) pH : Buffers used were sodium citrate (○), sodium acetate (▲), potassium phosphate (◆), and Tris-HCl (●).

(B) Temperature : Mixtures were incubated at various temperatures for 30 min.

(3) 金属イオンの影響

活性に対する種々の金属イオンの影響を Table 2 に示す。Cu^{2+}, Zn^{2+} は 1 mM で本酵素活性を完全に阻害した。また，Mn^{2+} は約60%の阻害を示した。酵素活性を促進する金属イオンは認められなかった。

(4) アデノシン脱アミノ反応の Km

脱アミノ反応に対するアデノシン濃度の影響を Fig. 7 に示す。Lineweaver-Burk plot から，本反応の Km 値は 128 μM と算定された。

(5) アデノシン誘導体，アナログに対する作用

本酵素はアデノシンに対する基質特異性が高く，アデニンや種々のアデニンヌクレオチドは全くあるいはほとんど基質としなかった。また，アデニン以外の核酸塩基を持つヌクレオシド，ヌクレオチドも基質としなかった。一方，2′-デオキシアデノシン，2′-O-メチルアデノシンにはアデノシンに匹敵する活性を示し，アデニン-9-アラビノシド，フオルマイシン A に対してはアデノシンに対するほぼ半分の活性を示した。3′-デオキシアデノシン，5′-デオキシアデノシンおよびアデニンの N^6 位，2 位，8 位が異なるアナログは，基質として利用されなかった。以上の結果を Table 3 に示す。

Table 2　Effect of metal ions on the activity of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51

Metal ions	Concentrations (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
$CaCl_2$	1	87.2
$MgCl_2$	1	100
$MnCl_2$	1	40.8
$CuCl_2$	1	0
$ZnCl_2$	1	0
EDTA*	10	87.7

*: Etylenediaminetetraacetic acid.

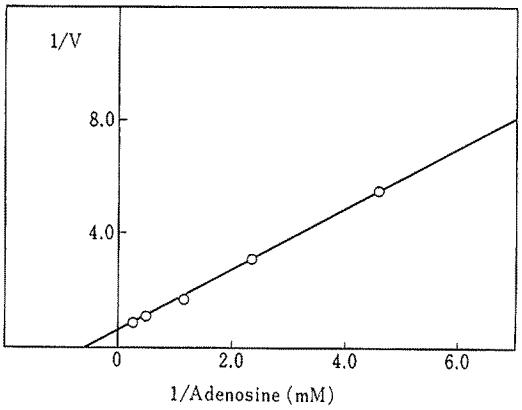

Fig. 7　Lineweaver-Burk plot of adenosine aminohydrolase for adenosine.

Table 3 には，基質となり得なかった種々の核酸塩基，それらのヌクレオシドおよびヌクレオチドとアデニン誘導体が本酵素のアデノシン脱アミノ活性に及ぼす影響についても示している。基質アデノシンの 2 倍濃度を加えても，アデニン，アデニンヌクレオチドおよび 5′-デオキシアデノシンは本酵素を全くあるいはほとんど阻害しなかった。一方，3′-デオキシアデノシン，N^6, N^6-ジメチルアデノシン，N^6-(2-イソペンテニル)アデノシン，2-クロロアデノシン，N^6-メチルアデノシンなどは 40-85%の強い阻害を示した。

考　　察

アデノシンアミノヒドロラーゼは種々の微生物で見い出されているが，細胞内酵素の場合は *in vitro* で失活しやすいため，その特性の報告は少ない。*Halobacterium cutirubrum*[15], *Micrococcus sodonensis*[16], *Escherichia coli*[17], *Pseudomonus iodium*[18], *Azotobacter vinelandii*[19], *Bacillus cereus*[20] の酵素は，失活を防ぐために Mg^{2+} [16,17], Mn^{2+} [16,17], エチレングリコール[17,19], エタノール[18], NH_4^+ [20], K^+ [20] を共存させている。*P. iodium* の酵素は安定剤なしの状態では分子量が 240×10^3 Da であるが，エタノールが存在すると 160×10^3 Da へと移行すると報告されている[18]。本報の海水ビブリオの酵素は分子量 30×10^3 Da のモノマー酵素で，分子量がそれぞれ 29×10^3, 26×10^3 Da の *E. coli*[17], *Klebsiella* sp.[22] のモノマー酵素に近いが，これらはともに誘導酵素で，前者はアデニン，ヒポキサンチンおよびそれらのヌクレオシドにより，また後者はアデノシンによって誘導生成される。本報の酵素はグルコースによって生合成が抑制されず[23]，構成酵素である。

Aspergillus oryzae[11], *Streptomyces* sp.[21] のアデノシンアミノヒドロラーゼは菌体外に分泌される。また，*M. sodonensis*[16] では細胞内酵素のほかに細胞膜結合型の酵素が認められている。本報の *Vibrio* sp. C-51 では，培養液から菌体を除去した上清や，細胞膜画分にはアデノシンアミノヒドロラーゼ活性は検出されなかった[23]。

A. oryzae の菌体外アデノシンアミノヒドロラーゼはアデニンヌクレオチドも脱アミノするなど，他の微生物由来酵素に比べ広い基質特異性を持つ。この酵素では，アデニン分子の 6 位のアミノ基と 7 位が酵素との結合に深く関係していることが示されている[12,13]。Table 3 によると，本報の酵素はアデニンまたはピラゾロピリミジ

Table 3 Specificity of adenosine aminohydrolase from *Vibrio* sp. C-51 for substrates and inhibitors

Compound	Deamination*1 (Relative activity)	Inhibition of adenosine deamination*2 (%)
Adenosine	100	ND*3
Adenine	0	13
AMP	5	7
ADP	0	0
ATP	0	3
ADP-ribose	0	ND
NAD	0	ND
2′-Deoxyadenosine 3′-monophosphate	6	ND
2′-Deoxyadenosine 5′-monophosphate	10	ND
2′-Deoxyadenosine 3′, 5′-cyclic monophosphate	6	ND
Puromycin	0	ND
Guanine	0	28
Guanosine	3	19
GMP	0	ND
Cytidine	2	ND
Cytosine	0	ND
2′-Deoxyadenosine	74	ND
3′-Deoxyadenosine	5	40
5′-Deoxyadenosine	3	0
2′, 3′-Deoxyadenosine	5	ND
Adenosine 2′, 3′-dialdehyde	4	ND
Adenosine 2′, 3′-acyclic dialcohol	5	ND
2′-O-methyladenosine	86	ND
N^6-Methyladenosine	0	85
N^6, N^6-Dimethyladenosine	0	42
2-Chloroadenosine	2	60
8-Azidoadenosine	1	ND
Adenine 9-arabinoside	52	ND
Formycin A	54	ND
N^6-(2-Isopentenyl) adenosine	0	47
Dihydroreatin riboside	0	4
Hypoxanthine	ND	9
Inosine	ND	11
IMP	ND	7

*1 : 2.5 mM, each.
*2 : Substrate (adenosine) 2.5 mM, inhibitor 5 mM, each.
*3 : Not determined.

ン環を有するヌクレオシドとのみ結合し，これを脱アミノする。アデニン残基の N^6 位と 2 位は酵素との結合に深い関連を持たない。糖残基の 5′ 位の OH 基は酵素との結合に必須であるが，2′- および 3′-OH は H や OCH_3 に置換され得る。また，リボースはアラビノースに代替され得る。

本研究室で調べた限り，すべての海水ビブリオは菌体外に与えられた NAD^+ を速やかに菌体内に取り入れ，これをヒポキサンチンにまで分解する。本酵素の示すこれら基質構造識別上の特徴は，Viblio のプリン代謝の特徴を反映しているものと思われる。応用面から考察すると，上に示した本酵素の安定性，基質/阻害剤特異性

は種々の核酸系医薬，植物生長調節物質の製造に，またアフィニティーリガンドとしてセンシングや物質分離に利用できるかも知れない。

文　献

1 HENDERSON, J. F., 1973 : "Nucleotide Metabolism, an introduction", Academic Press, Inc., New York, San Francisco, and London.

2 NEUHARD, J. and NYGAARD, P., 1987 : Purines and pyrimidines. *In* "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology (NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J, L., LOW, K, B., MAGASANIK, B., SCHAECHTER, M. and UMBARGER, H. E., eds.)", Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 445-460.

3 MA, P. F. and FISHER, J. R., 1968 : Multiple adenosine deaminases in the amphibia and their possible phylogenetic significance. *Comp. Biochem. Physiol.*, **27**, 687-694.

4 HOAGLAND, V. D. Jr. and FISHER, J. R., 1967 : Purification and properties of chicken duodenal adenosine deaminase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 4341-4351.

5 MA, P. F. and FISHER, J. R., 1968 : Two different hepatic adenosine deaminases in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta.* **153**, 153-159.

6 AKEDO, H., NISHIHARA, H., SHINKAI, K., KOMATSU, K. and ISHIKAWA, S., 1972 : Multiple formes of human adenosine deaminases. I. purification and characterization of two molecular species. *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 257-271.

7 DADDONA, P. E. and KELLEY, W. N., 1977 : Human adenosine deaminase. Purification and subunit structure. *J. Biol. Chem.*, **252**, 110-115.

8 SCHRADER, W. P. and STACY, A. R., 1977 : Purification and subunit structure of adenosine deaminase from human kidney. *J. Biol. Chem.*, **252**, 6409-6415.

9 WEISMAN, M. L., CAIOLFA, V. R. and PROLA, A. H., 1988 : Adenosine deaminase-complexing protein from bovine kidney. Isolation of two distinct subunits. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5266-5270.

10 藤井寿一，1988：アデノシンデアミナーゼ異常症．蛋白質核酸酵素，**33**, 606-609.

11 MINATO, S., TAGAWA, T. and NAKANISHI, K., 1965 : Studies on nonspecific adenosine deaminase from Takadiastase. I. Purification and properties. *J. Biochem.*, **58**, 519-525.

12 MINATO, S., TAGAWA, T., MIKAKI, M., SHIMIZU, B. and NAKANISHI, K., 1965 : Studies on nonspecific adenosine deaminase from Takadiastase. II. Studies on the structure of the substrates. *J. Biochem.*, **59**, 265-271.

13 MINATO, S., TAGAWA, T. and NAKANISHI, K., 1966 : Studies on nonspecific adnosine deaminase from Takadiastase. III. Studies on inhibitors. *J. Biochem.*, **60**, 352-356.

14 MINATO, S. and NAKANISHI, K., 1967 : Studies on nonspecific adenosine deaminase from Takadiastase. IV. Dechloronase activity. *J. Biochem.*, **62**, 21-25.

15 BAUER, R. J. and CARLBERG, D. M., 1973 : Adenosine aminohydrolase from *Halobacterium cutirubrum. Can. J. Biochem.*, **51**, 621-626.

16 PICKARD, M. A., 1975 : Purification and some properties of the soluble and membrane-bound adenosine deaminase of *Micrococcus sodonensis* ATCC 11880 and their distribution within the family Micrococcaceae. *Can. J. Biochem.*, **53**, 344-353.

17 NYGAARD, P., 1978 : Adenosine deaminase from *Escherichia coli. Methods Enzymol.*, **51**, 508-512.

18 SAKAI, T. and JUN, H.-K., 1978 : Purification and crystallization of adenosine deaminase in *Pseudomonas iodinum* IFO 3558. *FEBS Lett.*, **86**, 174-178.

19 TSUKADA, T. and YOSHINO, M., 1980 : Adenosine deaminase from *Azotobacter vinelandii.* Purification and properties. *Arch. Microbiol.*, **128**, 228-232.

20 GABELLIERI, E., BERNINI, S., PIRAS, L., CIONI, P., BALESTERI, E., CERCIGNANI, G. and FELICIOLI, R., 1986 : Purification, stability, and kinetic properties of highly purified adenosine deaminase from *Bacillus cereus* NCIB 8122. *Biochim. Biophys. Acta*, **884**, 490-496.

21 JUN, H.-K., KIM, T.-S. and SAKAI, T., 1991 : Purification and characterization of extracellular adenosine deaminase from a *Streptomyces* sp. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 6-11.

22 LING, F., INOUE, Y. and KIMURA, A., 1991 : Purification and characterization of adenosine deaminase from *Klebsiella* sp. LF 1202. *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 89-92.

23 高井義之，1992：海水ビブリオの NAD^+ 分解酵素系について．日本大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士論文．7-33.

24 CHANEY, A. L. and MARBACH, E. P., 1962 : Modified reagents for determination of urea and am-

monia. *Clin. Chem.*, **8**, 130-132.

25 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951 : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

26 LAEMMLI, U. K., 1970 : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

27 ANDREW, P., 1951 : The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, **96**, 595-606.

28 WEBER, K. and OSBORN., 1969 : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.