

ニホンキジ卵白リゾチームに関する研究(1)

誌名	九州東海大学農学部紀要
ISSN	02868180
著者	鳥潟, 隆雄 蔵本, 真由美 荒木, 朋洋
巻/号	7巻
掲載ページ	p. 73-79
発行年月	1988年3月

ニホンキジ卵白リゾチームに関する研究 I. 精製, タンパク質的性質及び触媒作用

鳥潟隆雄・蔵本真由美*・荒木朋洋

Studies of Japanese Pheasant Lysozyme I. Purification, General Properties of Protein and Catalized Reaction.

Takao TORIKATA, Mayumi KURAMOTO and Tomohiro ARAKI

(Accepted September 30, 1987)

Japanese pheasant lysozyme was purified by the steps of extract, pH-treatment and column chromatography with CM-Toyopearl. The molecular weight of Japanese pheasant lysozyme was estimated to be 14000 by SDS-polyacrylamide electrophoresis, indicating that it should be classified as a hen-type lysozyme. The amino acid composition gave almost the same numbers of amino acid residue as those of ring-necked pheasant lysozyme, and the amino terminal sequence was quite similar to that of ring-necked pheasant lysozyme. The experimental time-courses of Japanese pheasant lysozyme were measured with substrate of chitopentaose (GlcNAc)₅ at pH5.0 and 50°C. The characteristic features of the time-courses were increased production of (GlcNAc)₄. The increased production of (GlcNAc)₄ may be caused by the nature of subsite F involved Lys-His residues.

From the experimental time-courses, the values of reaction parameters were estimated by computer analysis. The binding energy of subsite F was -1.3 kcal/mole, shown to be slightly lower affinity for (GlcNAc)₅ than that of hen lysozyme (-1.5 kcal/mole). The value of the rate constant of the cleavage of glycosidic linkage, k_{+1} , was estimated to be 0.5 s⁻¹. This value decreased to 1/2 in comparison with that of hen lysozyme. The k_{+1} value was considered to relate closely to the fine structure of subsite F.

緒 言

リゾチーム (EC3.1.2.17) は、広く生物界に分布する糖加水分解酵素である。1967年、BLAKE *et al.* はニワトリ卵白リゾチーム (Hen Egg-white Lysozyme: HEWL) を用いて、リゾチーム及びその酵素・基質複合体の3次元構造を解明するとともに触媒機構をも推定した²⁾。すなわち、リゾチームは、6個の基質結合部位 (A, B, C, D, E, F) からなり、それぞれの部位に1個の糖残基が特有の形式で結合することを示し、D部位に結合した糖残基の立体構造の歪みによってD-E部位間でグリコシ

ド結合が開裂すると推定した²⁾。

その後、3次元構造をもとにして、リゾチーム反応の詳細な研究が行われ、リゾチームは単純な加水分解酵素で説明できない複雑な反応を行うことが明らかとなった⁸⁾。リゾチーム反応の複雑性は、他の多糖類加水分解酵素に見られない高能率な糖転移反応の触媒能に由来すると考えられている^{5, 17, 19, 1)}。しかし、リゾチームの糖転移反応の発現機構は明らかでない。

E・F部位は転移反応のアクセプターが結合し、転移反応の能率に関与する^{5, 17, 19)}。PINCUS *et al.* は HEWL における酵素・基質複合体の構造エネルギーの計算から、F部位はX線解析で推定されるものと異なり、空間的に広い領域を持ち、2通りに基質が結合できることを予測した。すなわち、F部位は Arg 45, Asn 46, Thr 47の関

畜産学科生物化学研究室

*一般教育

与する位置 ('left' side) と phe 34, Asn 113, Arg 114 の関与する位置 ('right' side) の2ヶ所に基質が結合できると述べている。さらに, 'right' side に結合する基質はX線解析で推定されたようにD部位上の糖残基が歪む(半椅子型)酵素・基質複合体を形成し, 反応生成物を生じる (productive) が, 一方, 'left' side の複合体はD部位上の糖残基に歪みのない(椅子型)構造で, 反応生成物を生じない (non-productive) と推定した^{15, 16)}。

F部位に2通りの結合位置があることは, すでにシチメンチョウリゾチームのX線解析で示唆されていた²¹⁾。さらに, 最近リングネックキジリゾチーム (ring-necked pheasant lysozyme: RNPL) で実験的に証明された²²⁾。RNPLは, HEWLと比較して, F部位の'right' sideに関与するAsn 113 - Arg114 (HEWL) がLys - Hisに置換している⁹⁾。RNPLの'left' sideは, 関与するアミノ酸残基に置換がなく, HEWLと同じ構造を持つと考えられている⁹⁾。このようなRNPLにおいて, 'left' sideに結合するモノクローナル抗体が基質のN-アセチルグルコサミンの6量体 (GlcNAc)₆で置換されること, またHEWLと比較して, 基質 (GlcNAc)₆に対し解離定数はほぼ同じ値, 触媒定数 (Kcat) は別の値が観察された。この結果から, (GlcNAc)₆は'left' sideに結合し, 酵素・基質複合体が形成されることを示している。さらにHEWLと同じ解離定数であることから, この酵素・基質複合体の形成に'right' sideは関与しないと考えられた。触媒定数 (k cat) の減少は'right' sideのアミノ酸の置換に起因しており, 'right' sideは酵素・基質複合体の遷移状態 (transition state) に関与すると推定された²²⁾。

著者らはRNPLと同様にF部位の'right' sideがLys113-His114であるホロホロチョウ卵白リゾチームの反応を詳細に検討した。その結果, 'right' sideのAsn113-Arg114 (HEWL) からLys113-His114への置換は, リゾチームの反応を変動させることが明らかとなった⁷⁾。

このように, F部位の構造は, 酵素・基質複合体の形成, その遷移状態やさらに触媒作用に影響すると考えられる。しかし, F部位の詳細な構造, さらに構造と活性との関連に関する研究はあまり行われていない。キジ科のリゾチームは, F部位に関与するアミノ酸残基が置換しており, F部位の研究に適した材料と考えられる。本研究はニホンキジ卵白リゾチーム (Japanese pheasant lysozyme: JPL) の精製, タンパク質的性質, 触媒作用について報告する。

材料及び方法

キジの卵 ニホンキジ (*Phasianus versicolor*) の卵は熊本県養鶏試験場より供与された。

1. ニホンキジ卵白リゾチームの精製

JPLは抽出, pH処理, CM-陽イオン交換カラムクロマトグラフィーの過程によって精製した。

ニホンキジ卵白70mlに3倍量の蒸留水 (210 ml) を加え30分間攪拌した後, 遠心分離 (12,000rpm, 30 min) し, その上清を粗抽出液とした。

粗抽出液は1 N酢酸でpH4.0にし, 30分間室温で攪拌した後, 遠心分離 (12,000rpm, 30 min) によって沈澱物を除去した。その上清は, 0.1M塩化ナトリウムを含む0.03Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に透析した後, 陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。陽イオン交換クロマトグラフィーは, CM-トヨパール (東洋曹達製) を用いて行った。CM-トヨパールカラム (2.8×77cm) は0.1M塩化ナトリウムを含む0.03Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で十分に平衡化した後, 試料を吸着させた。溶出は, 同緩衝液で十分洗浄した後, 0.03Mリン酸緩衝液中塩化ナトリウム濃度を0.1Mから0.3Mまで直線的な濃度勾配で増加させて行った。溶出時の流速は20ml/hrで行い, 溶出液は6 mlずつフラクションコレクターで分取した。

2. N-アセチルグルコサミンのキトオリゴ糖の分離・精製

N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のキトオリゴ糖の分離・精製はRUPLEYの方法で行った¹⁸⁾。すなわち, キチンを塩酸で部分的に加水分解し, チャコール-セライト (charcoal-celite) カラム又はセルロファイニングCL-25m (チッソ製) によるゲルろ過で分離・精製した。得られたキトオリゴ糖は, 高速液体クロマトグラフで均一性を確かめた後, 実験に用いた。

3. リゾチームの活性測定

リゾチームの溶菌作用を利用して活性測定を行った²⁰⁾。すなわち, 酵素反応は室温で, 基質溶液に酵素溶液を加えて行い, 基質溶液の濁度の減少を540nmの波長で測定した。基質溶液は, *Micrococcus Lysodeikticus* の菌体 (Sigma製) を0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁したものを用いた。酵素の単位は, 酵素溶液1 mlが室温 (25°C) で1分間に基質溶液の濁度を0.1減少させる活性の強さを1単位 (unit) とした。

4. タンパク質の濃度

タンパク質の濃度は, 280nmにおける紫外吸収法又はLowry法¹²⁾で測定した。

5. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法

精製酵素標品の均一性の検討及び分子量の測定は,

LAEMMLIの方法¹¹⁾にしたがって、SDS・ポリアクリルアミド電気泳動法で行った。試料はメルカプトエタノール、SDSを含む0.05M トリス緩衝液中100℃で10分間加熱した後、泳動に供した。ゲルは1% SDSと12.5%のアクリルアミドに成るように調製し、泳動は泳動管(0.5×12cm) 1本当たり2 mAで5時間行った。分子量は標準タンパク質を同時に泳動し、その相対移動度から算出した。

標準タンパク質はウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, M.W.68,000), オボアルブミン (ovalbumin, M.W.43,000), キモトリプシノーゲン A (chymotrypsinogen A, M.W.25,700), シトクロームc (cytochrome c, M.W.12,500) (ペーリンガー・マンハイム製)を用いた。

6. アミノ酸分析

JPLのアミノ酸分析は、6 N塩酸で110℃, 24, 48, 72時間加水分解した後行った。シスチンは、試料を過塩酸酸化した後、6 N塩酸で加水分解した¹⁴⁾。分析は、日立835型アミノ酸分析計(日立製)で行った。

7. N末端アミノ酸配列

N末端配列の決定は、4-N,N-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate (DABITC)を用いた微量手動エドマン法で行った¹⁾。

8. リゾチーム反応の基質及び反応生成物のタイムコース

リゾチームの反応はN-アセチルグルコサミンの5量体(GlcNAc)₅を基質として用い、その基質及び反応生成物は高速液体クロマトグラフィーで分離定量した。

反応は、 1×10^{-4} M JPL, 1×10^{-3} M (GlcNAc)₅, pH5.0, 50℃で行った。反応開始後、一定時間毎に反応液(500 μl)を取り、ドライアイスアセトン中で急冷し反応を停止した。さらにリゾチームを除去するためBio-Rex70 (85mg) (Bio-Rad製)を加え遠心分離(3000 rpm, 10 min)し、その上清(200 μl)を凍結乾燥した。乾燥物は冷水(50 μl)にとかし高速液体クロマトグラフィーに供した。高速液体クロマトグラフィーは2本連結TSK-GEL G2000PWカラム(東洋曹達製)を装着したJASCO TRI ROTAR-II(日本分光製)で行った。

溶出は純水を用い、流速0.3ml/min, 圧力10kg/cm²で行い、N-アセチルグルコサミンのオリゴマーは220nmの吸光度で検出した。(GlcNAc)₁から(GlcNAc)₅までの標準試料を用い、濃度とピーク面積のプロットから標準曲線を作成した。反応生成物の各オリゴマーの濃度は、ピーク面積を測定し標準曲線から求めた。

9. リゾチーム反応のコンピュータ・シミュレーション

計算で求める基質・反応生成物のタイムコースは、

MASAKI *et al.*の方法に従ってリゾチームの反応を数式モデル化し、数値計算によって求めた¹³⁾。すなわち、実験で得られたタイムコースに一致するように、速度式に酵素濃度、基質濃度、3つの速度定数、6つの基質結合エネルギーを変化させて計算した。

結果及び考察

JPLの精製と均一性

JPLは、抽出、pH処理、CM・トヨパール陽イオン交換クロマトグラフィーの過程で精製した。CM・トヨパール陽イオン交換クロマトグラフィーで単一のピークが得られた(第1図)。リーバースキジ(*Reeve's pheasant, Symotlicus reevesi*)の卵白からはBio-Rex70陽イオン交換クロマトグラフィーによって2種類のリゾチームが得られたが⁹⁾、ニホンキジ卵白は、1種類のリゾチームのみ含んでいた。本精製過程によって、全卵白タンパク質3959.3mgからリゾチーム48.6mgが得られ、活性の回収率は粗抽出液の77%であった。

リゾチームは、一本のポリペプチド鎖で構成されているので、精製したJPLの均一性と分子量の検討はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で行った。

第2図に示すように、単一のバンドとして得られたので、精製標品は均一であることが確認された。標準試料の分子量と相対移動度(Rf)の標準曲線から、JPLの分子量は約14,000と推定された。リゾチームは、分子量約14,000のニワトリ型と約20,000のガチョウ型の2種が知られている¹⁰⁾。したがって、JPLはニワトリ型と考えられる。

アミノ酸分析

キジ科のリゾチームの中で、RNPLの1次構造が明らかにされている。すなわち、RNPLはHEWLと比較して、1個多い130個のアミノ酸残基で構成され、9個の残基が置換している⁹⁾。6個の基質結合部位に関与するアミノ酸残基は、F部位のAsn113-Arg114(HEWL)がLys-Hisに置換しているだけである。第1表はRNPLとJPLのアミノ酸組成を示した。両酵素はほとんど同じ組成を示し、同じ1次構造が推定された。すなわち、2個のHis残基のうち1個はF部位に存在し、Lys-Hisの配列が考えられる。

N末端アミノ酸の配列分析

RNPLのN末端からの配列⁹⁾はGly-Lys-Tyr-Gly-Arg-Cys-Glu-Leuで、HEWLのN末端からLys-Val-Phe-Gly-Arg-Cys-Glu-Leuの配列³⁾にGlyが1個付加されている。鳥類、ほ乳動物から得られたニワトリ型のリゾチームはN末端が全てLysである¹⁰⁾。他のキジ科の5種のリゾ

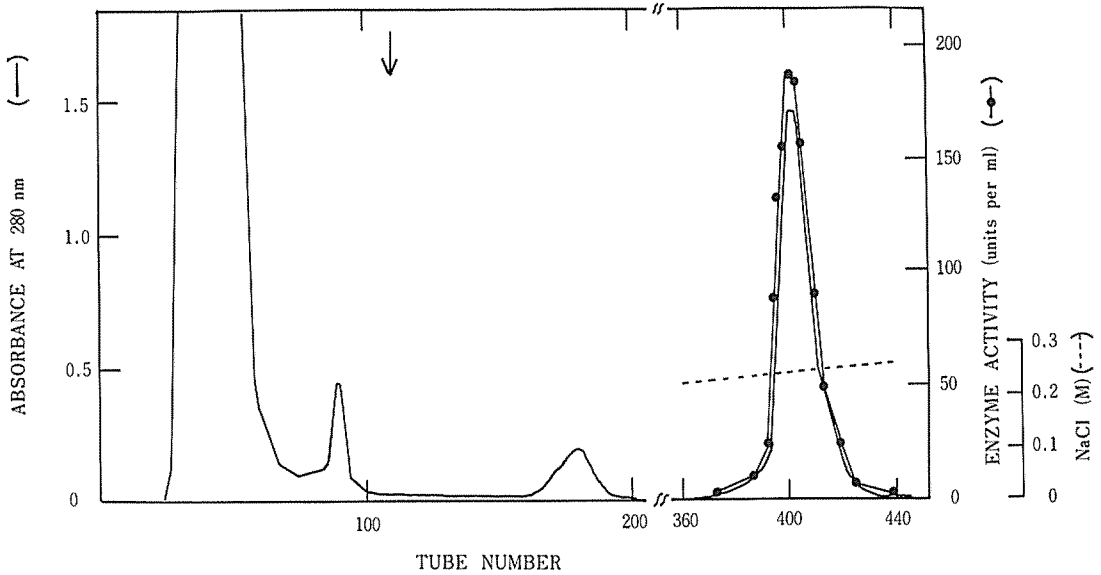


Fig. 1. Ion-exchange chromatography of Japanese pheasant lysozyme on CM-Toyopearl column (2.8×77cm). The elution was carried out with a linear gradient of NaCl (0.1-0.3M) in 0.03M phosphate buffer (pH 7.0) from an arrow in Fig.

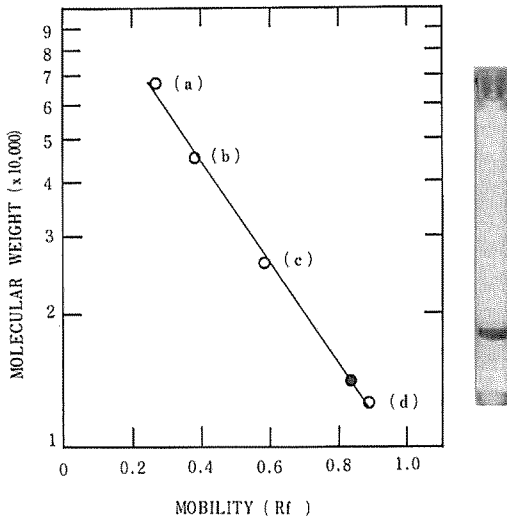


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and determination of molecular weight of Japanese pheasant lysozyme.

The standard proteins used were : (a) bovine serum albumin (M. W. 68,000), (b) ovalbumin (M. W. 43,000), (c) chymotrypsinogen A (M. W. 25,700), (d) cytochrome c (M. W. 12,500). The elution position of Japanese pheasant lysozyme is indicated by the closed circle.

Table 1. Amino acid composition of Japanese pheasant lysozyme.

Amino acid	Ring-necked pheasant lysozyme ^{b)}	Japanese pheasant lysozyme ^{a)}
Asp ^{c)}	20	20.7
Thr	7	7.3
Ser	10	10.3
Glu ^{d)}	3	3.2
Pro	2	1.7
Gly	14	14.3
Ala	11	11.2
Val	7	7.2
Met	3	2.3
Ile	6	5.9
Leu	8	8.1
Tyr	4	3.8
Phe	2	2.0
Lys	8	8.0
His	2	1.9
Arg	9	8.6
Cys ^{e)}	8	7.6
Trp	6	

a) All values were expressed as molar ratios normalized to a value of 8.0 for leucine. b) Calculated from the sequence reported by JOLLES *et al*⁹⁾. c) Represented both Asp and Asn. d) Represented both Glu and Gln. e) Determined as cysteic acid.

チームのN末端もLysであり⁹⁾, RNPLはLysにさらにGlyが付加した特徴的なリゾチームである。JPLに対して、エドマン法でN末端から6個のアミノ酸残基を決めた。その結果、N末端からの配列はGly-Lys-Val-Tyr-Gly-Arg.と決定され、RNPLと同一配列を示し、N末端はGlyと確認された。N末端の配列からもJPLは、RNPLと同じ1次構造と推定された。

基質及び反応生成物のタイムコース

RNPLは、HEWLと比較して、基質 (GlcNAc)₆ に対し解離定数はほぼ同じ値を示すが、触媒定数 *k*cat は1/2の値と報告されている²²⁾。この *k*cat は (GlcNAc)₆ → (GlcNAc)₄ + (GlcNAc)₂ の単純な触媒定数を測定したにすぎない¹¹⁾。しかし、リゾチームは、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の多糖類を基質として、グリコシド結合の加水分解と共に糖転移による新グリコシド結合の生成を触媒する^{5, 17, 19)}。したがって、リゾチームの反応は、加水分解生成物及び糖転移反応生成物がつぎの繰り返し反応の基質あるいは糖転移反応のアクセプターとなる。このような反応が繰り返されるので、反応生成物は複雑である。リゾチームの触媒機構を研究する場合、活性を正確に把握することが重要である。著者らは、リゾチームの反応に対して、反応生成物のタイムコースを求め、そのタイムコースをコンピュータ・シミュレーションし、基質結合部位の結合エネルギー、グリコシド結合解裂の速度定数 (*k*₊₁)、加水分解反応の速度定数 (*k*

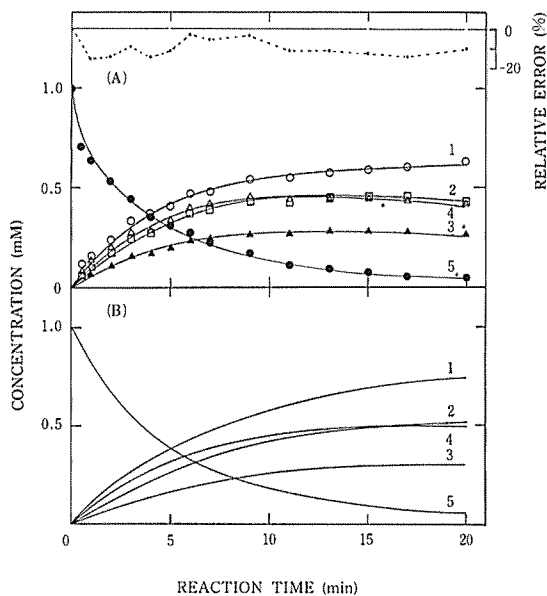


Fig. 4. Time-courses of Japanese pheasant lysozyme. (A) Experimental time-courses. Initial concentrations of lysozyme and substrate were 1.0×10^{-4} M and 1.0×10^{-3} M, respectively. The reaction was carried out at pH5.0 and 50°C. Numerals indicated degree or n-value of (GlcNAc) n. (B) Calculated time-courses. Parameter-values used are listed in Table 2.

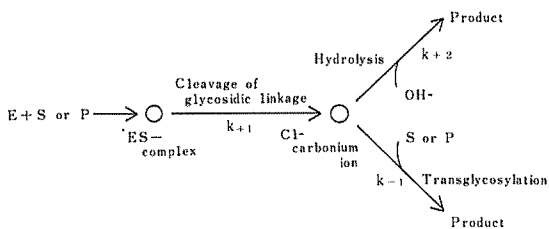


Fig. 3. Simplified model scheme for the lysozyme-catalyzed reaction.

+₂), 糖転移反応の速度定数 (*k*₋₁) のパラメータ (第3図) で、解析する方法を確立した^{6, 13)}。

JPLの基質及び反応生成物のタイムコースは、(GlcNAc)₅を基質として測定した (第4-A図)。初期基質の (GlcNAc)₅は20分間で消失し、反応生成物の量は (GlcNAc)₁ > (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₂ > (GlcNAc)₃ の順であった。HEWL¹³⁾と比較して、特徴的なのは (GlcNAc)₄の増大である。この (GlcNAc)₄の増大はホロホロチョウ卵白リゾチーム⁷⁾にも観察され Asn113-Arg114がLys-Hisに置換したことによると推定された。実験タ

イムコースに対するコンピュータ・シミュレーションは、HEWLにおける結合エネルギーと速度定数¹³⁾を基本にして、F部位の結合エネルギーを変化させ、次に速度定数を変え計算した。実験タイムコースに最もよく適合した計算タイムコースを第4-B図に示した。このタイムコースから得られた結合エネルギーと速度定数は第2表に示した。F部位の結合エネルギーは-1.3kcal/moleで、HEWLの-1.5kcal/moleから0.2kcal/mole減少した。速度定数は、HEWLと比較して、グリコシド解裂反応の速度定数 *k*₊₁が1/2の値に減少した。しかし、加水分解反応の速度定数 *k*₊₂と糖転移反応の速度定数 *k*₋₁に変化はなかった。すなわち、F部位の 'right' sideの Asn113-Arg114 (HEWL) から Lys-His への置換はF部位の結合エネルギーとグリコシド解裂反応の速度定数の減少をもたらした。

基質 (GlcNAc)₆は 'left' side に結合し、この時点の酵素・基質複合体は non-productive で、次に productive な複合体に移行する際、すなわち遷移状態に 'right' side が関与するとの推定がなされている²²⁾。本研究におい

Table 2. Binding free energies of subsites and rate constants.

Lysozyme	Binding free energy (kcal/mole)						Rate constant (s ⁻¹)		
	A	B	C	D	E	F	k ₊₁	k ₋₁	k ₊₂
Pheasant	-2.0	-3.0	-5.0	+4.5	-2.5	-1.3	0.50	40.0	0.3
Hen ^{a)}	-2.0	-3.0	-5.0	+4.5	-2.5	-1.5	0.93	40.0	0.3

a) Cited from Ref. 13.

ても, 'right' side の環境の変化は, 基質結合力に変化をもたらし, さらにグリコシド解裂反応に影響することから, F 部位の構造が酵素・基質複合体の形成やその遷移状態の結合様式に密接に関与し, その結果グリコシド解裂反応が変動することを示している。

F 部位の 'left' と 'right' side がどのような過程で酵素・基質複合体に関与するのか, さらにグリコシド解裂反応に影響するのは今後の問題である。このような研究を分子構造的に進めるには, 基質結合部位の構造と活性をより詳細に検討することが必要であろう。JPL は, リゾチーム反応に対する F 部位の役割を検討する上で優れた材料と考えられる。今後, 1 次構造を検討し, それを基にして, 化学修飾等で F 部位のミクロな環境変化を起こさせ, それに誘起される活性の変動を解析する予定である。

要 約

キジ科のリゾチームは 6 個の基質結合部位の内 F 部位の 'right' side に関与するアミノ酸残基がニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) の Asn113-Arg114 から Lys-His に置換している。リゾチームの反応機構に対し, F 部位の役割を明らかにする目的で, ニホンキジ卵白リゾチーム (JPL) を検討した。

JPL は, 抽出, pH処理, CM-陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製した。精製標品は SDS-アクリルアミドゲル電気泳動法で均一であり, また分子量は約 14,000 であった。アミノ酸組成, N 末端配列はリングネックキジリゾチーム (RNPL) に一致し, 同酵素と同じ 1 次構造を持つと推定された。基質 (GlcNAc)₅ を用いて, 酵素反応を行い基質や反応生成物のタイムコースを求め, コンピュータ分析を行った。その結果, HEWL と比較して, F 部位の基質結合エネルギーの減少とグリコシド結合解裂反応の速度定数の減少が観察された。しかし, 加水分解反応と転移反応の速度定数に変化はなかった。したがって, F 部位の構造変化が F 部位における基質の結合様式やグリコシド解裂反応に密接に関連すると推定

された。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 卒論研究として協力頂きました都築政三君に感謝を致します。

ニホンキジの卵は熊本県養鶏試験場より提供して頂きました。ここに謝意を表します。

本研究の一部は, 文部省科研費 (課題番号 60560103) の補助を受けて行った。

引用文献

- 1) BANERJEE, S. K., E. HOLLER, G. P. HENS and J. A. RUPLEY, 1975, Reaction of N-acetylglucosamine oligosaccharides with lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4355-4367.
- 2) BLAKE, C. C. F., L. N. JOHNSON, G. A. MAIR, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS and V. R. SARMA, 1967, Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.*, **B167**: 378-388.
- 3) CANFIELD, R. E., 1963, Peptides derived from tryptic digestion of egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **238**: 2691-2697.
- 4) CHANG, J. Y., D. BRAUER and B. WITTMANN-LIEBOLD, 1978, Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.*, **93**: 205-214.
- 5) CHIPMAN, D. M., J. J. POLLOCK and N. SHARON, 1968, Lysozyme-catalyzed hydrolysis and transglycosylation reactions of bacterial cell wall oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, **243**: 487-496.
- 6) FUKAMIZO, T., T. TORIKATA, S. KUHARA and K. HAYASHI, 1982, Human lysozyme-catalyzed reaction of chitooligosaccharides. *J. Biochem.*, **92**: 709-716.

- 7) FUKAMIZO, T., T. TORIKATA, T. NAGAYAMA, T. MINE-MATHU and K. HAYASHI, 1983, Enzyme activity of avian egg-white lysozyme, *J. Biochem.*, **94** : 115-122.
- 8) IMOTO, T., L. N. JOHNSON, A. C. T. NORTH, D. C. PHILLIPS and J. A. RUPLEY, 1972, Vertebrate lysozymes in P. D. Boyer (ed.), *Enzyme*, 7, 3rd Ed, Academic Press, New York, 665-868.
- 9) JOLLES, J., M. I. IBRAHIMI, E. M. PRAGER, F. SCHOENTGEN, P. JOLLES and A. C. WILLSON, 1979, Amino acid sequence of pheasant lysozyme. Evolutionary change affecting processing of prelysozyme, *Biochemistry*, **18** : 2744-2754.
- 10) JOLLES, P., I. BERNIER, J. BERTHOU, J. CHARLEMAGNE, J. FAURE, J. HERMANN, J. JOLLES, J. P. PERIN and J. SAINT-BLANCARD, 1974, From lysozymes to chitinases : Structure, kinetics and crystallographic studies in E. F. OSSERMAN, R. E. CANFIELD and S. BEYCHOK (ed), *Lysozyme*, Academic Press, New York and London, 31-54.
- 11) LAEMMLI, U. K., 1970, Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, **227** : 680-685.
- 12) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275.
- 13) MASAKI, A., T. FUKAMIZO, A. OTAKARA, T. TORIKATA, K. HAYASHI and T. IMOTO, 1981, Estimation of rate constants in lysozyme-catalyzed reaction of chitooligosaccharides, *J. Biochem.*, **90** : 1167-1175.
- 14) MOORE, S., 1963, On the determination of cystine as cysteic acid, *J. Biol. Chem.*, **238** : 235-237.
- 15) PINCUS, M. R., S. S. ZIMMERMAN and H. A. SCHERAGE, 1977, Structures of enzyme-substrate complexes of lysozyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** : 2629-2633.
- 16) PINCUS, M. R. and H. A. SCHERAGE, 1981, Prediction of the three-dimensional structures of complexes of lysozyme with cell wall substrates, *Biochemistry*, **20** : 3960-3965.
- 17) POLLÖCK, J. J. and N. SHARON, 1970, Studies on the acceptor specificity of the lysozyme-catalyzed transglycosylation reaction, *Biochemistry*, **9** : 3913-3925.
- 18) RUPLEY, J. A., 1964, The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **83** : 245-255.
- 19) RUPLEY, J. A., V. GATES and R. BILBERY, 1968, Lysozyme catalysis. Evidence for a carbonium ion intermediate and participation of glutamic acid 35, *J. Am. Chem. Soc.*, **90** : 5633-5635.
- 20) SALTON, M. R. J., 1952, Cell wall of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme, *Nature*, **170** : 746-747.
- 21) SARMA, R. and R. BOTT, 1977, Crystallographic study of turkey egg-white lysozyme and its complex with a disaccharide, *J. Mol. Biol.*, **113** : 555-565.
- 22) SMITH-GILL, S. J., J. A. RUPLEY, M. R. PINCUS, R. P. CARTY and H. A. SCHERAGE, 1984, Experimental identification of a theoretically predicted "left-sided" binding mode for (GlcNAc)₆ in the active site of lysozyme, *Biochemistry*, **23** : 993-997.