

# 枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼに対するKイオンの 不可逆的阻害とパルス電場による復活現象 (I)

## Irreversible Inhibitive Effect of Kalium Ion on the Activity of $\alpha$ -Amylase (from *Bacillus subtilis*) and the Restoration by Pulse Electricity(I)

井 村 洋 一

本紀要：第5巻<sup>1)</sup>に記載したように、試験管中に長期間培養されたゾーリムシに対し、100 KHz程度の脈流はその分裂能力を顕著に促進することが認められた。この現象は空気以外は閉塞された試験管中の単細胞生物に関するものではあるが、一般に多細胞生物の加齢はその細胞の分裂能力と相関するといわれるので、本報文は以上の細胞レベルにおける電氣的効果は、これを酵素による分子レベルで意味づけようとするならばどのような現象が想定されるであろうかということ、枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼを用いて実験的に推理したものである。結果として、細胞内に対イオンとして最も多量に存在する $K^+$ は $Na^+$ に比較して $\alpha$ -アミラーゼに不可逆的に結合し、その活性を阻害する性質が強いこと、さらにこの阻害はパルス電場によって復活させうることが認められた。

### 第1篇 K-AceとNa-Aceによる不可逆的阻害の比較

#### I. SIGMA社製 粗製 $\alpha$ -アミラーゼIII-A型〔黒色粉末〕について

##### 1. 緒 言

###### 1.1 $\alpha$ -アミラーゼ試薬について

枯草菌 $\alpha$ -アミラーゼは試薬として種々の製品が販売されているが、いづれも精製されたうえ、なかには添加物が含まれているものもあり、本実験の目的には不相当であったので、試料としては米国SIGMA社製、 $\alpha$ -AMYLASE BACTERIAL CRUDE, TYPE III-A.(無添加物)を用いた。

しかしながら、同社のIII-A型にも全く精製を経ないと考えられる〔黒色粉末〕のもの、おそらくメタノールによる脱色精製を経たと推定される〔黄褐色粉末〕のものとの2種類があり、前者は10%水溶液とすると完全に溶解し、製品に記載された力価も高く、最も自然の

形に近いと考えられるが、これに対して後者は精製の過程でやや変性が生じたと考えられ、記載されている力価も低く、10%水溶液にしたとき多量の沈殿を生じるため、実験の試料としてはその上澄の部分を採用して用いなければならなかった。

また、K-AceとNa-Aceによる阻害性にも、以上2種類の $\alpha$ -アミラーゼには大差があったので、両者に対する実験結果はIとIIに分けて記述することにした。

###### 1.2 実験条件について

もともと、粉末状まで乾固された酵素は、これを再び水溶液にもどしても、もはや完全に自然の形に復元するわけではないが、試験管内で酵素の活性を測定するばあいにも、温度、pH、溶液のイオン濃度、酵素に対するイオン特異性、酵素自体も含めて溶液中に存在する種々の

物質の濃度等、多くの条件が考えられる。

しかしながら、本稿に述べる実験は、 $K^+$ と $Na^+$ の $\alpha$ -アミラーゼに対する不可逆的阻害性の強さを比較することが目的であるから、これらの各条件は目的に応じて任意に設定し、その実験結果から、生きている細胞中の酵素の推移について近似的に推定することを試みた。

## 2. アミラーゼ活性の測定方法と活性度

試料溶液 2 ml をポリエチレン製小試験管にとり、 $30^\circ C$  の恒温槽に 7 分放置したのち、2% デキストリン 0.1 ml をマイクロリンジで添加する。分解時間 4 分ののち、その 1 ml を 0.1 N HCl 10 ml 中に採取し、これに発色試薬として、0.15%  $I_2$ 、1.5% KI 溶液 1 ml を添加して未分解のデキストリンを定量する。

この測定方法は、デキストリンがデンプンに比較してヨウ素による発色が安定していること、添加する基質が微量であるため母液の組成にほとんど変化がないことなどのため、本実験の目的には充分な精度でアミラーゼ活性を定量し比較することができた。

アミラーゼの活性度は、上記の方法によって定量される分解されたデキストリン量を、添加量に対する百分率で表わした。

## 3. 添加塩の濃度とアミラーゼ活性

### 3.1 室温におけるさく酸塩と塩化物の影響

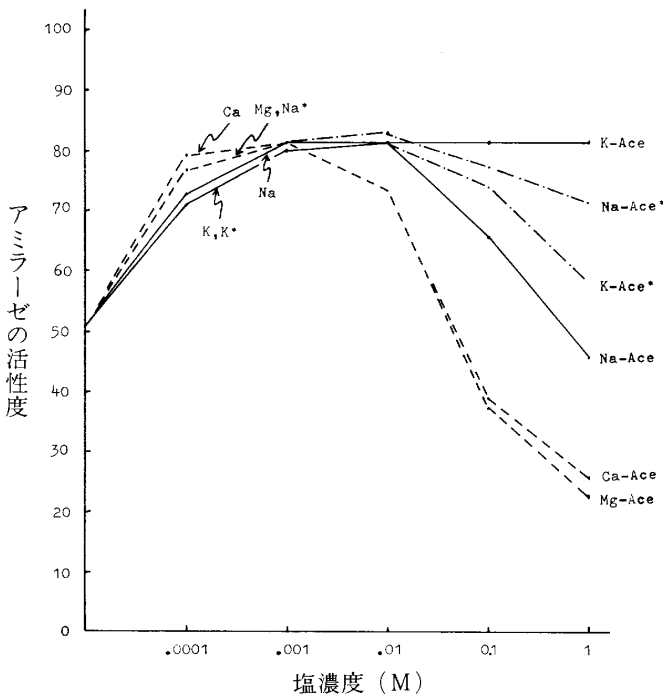


図 1. 室温におけるさく酸塩濃度の影響  
アミラーゼ：0.001%  
1 M の PH : Na-Ace 8.4 K-Ace 7.1 Ca-Ace 7.7  
Na-Ace\* 7.4 K-Ace\* 7.8 Mg-Ace 7.8

図 1 は、室温において 0.001% アミラーゼに  $K$ 、 $Na$  および  $Ca$ 、 $Mg$  さく酸塩を種々の濃度で添加したばあいの塩濃度と活性度の関係である。Na-Ace\* は 1 M Na-Ace 100 ml に 0.2 N H-Ace 1.2 ml を添加して pH を 8.4 から 7.4 に、K-Ace\* は 1 M K-Ace 100 ml に 0.2 N KOH 2 ml を添加して pH を 7.1 から 7.8 に調整したものである。

図 2 は、同じく塩化物の濃度と活性度の関係であるが、さく酸塩のばあいに比較してやや不規則な曲線群となる。

図 1 において、 $K$  および Na-Ace はいずれも  $10^{-3}$  ~  $10^{-2} M$  に最大点をもち、これより高濃度側では各さく酸塩について pH が高いほど阻害性が大であるから、この阻害は  $K^+$  と  $Na^+$  のアミラーゼに対する結合の程度によることが推定される。

また、 $\alpha$ -アミラーゼに対する必須金属イオンである  $Ca^{++}$  も  $10^{-3} M$  以上で  $Mg^{++}$  と同程度の強い阻害性を示す。

### 3.2 さく酸塩と塩化物のアミラーゼに対する安定性の比較

さきの図 1 と図 2 を比較して、室温においてもさく酸塩は塩化物よりアミラーゼに対して安定した活性をあたえるが、表 1 は各溶液を  $60^\circ C$  に 60 分保持したのちの活性度を示したもので、各金属イオンごとにさく酸塩の方が塩化物よりも大きい安定性をあたえることがさらに明瞭である。

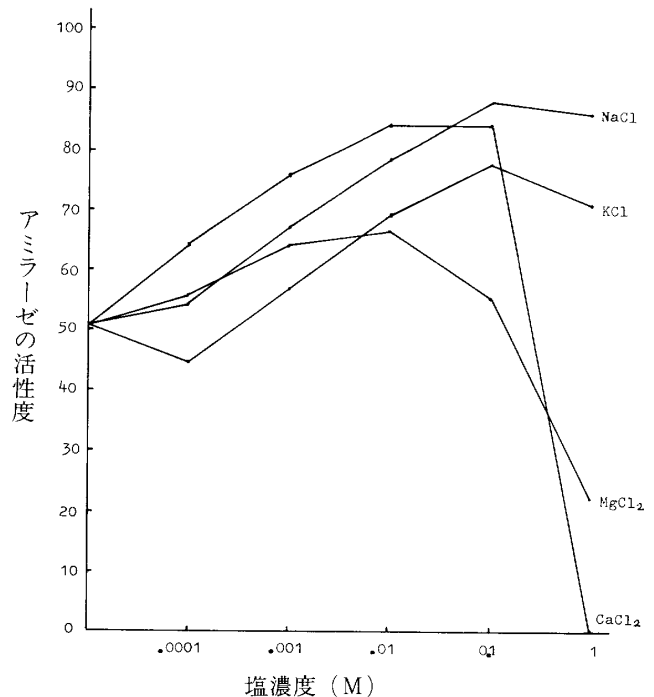


図 2. 室温における塩化物濃度の影響  
アミラーゼ：0.001%  
1 M の pH : NaCl 6.1 CaCl<sub>2</sub> 8.7  
KCl 5.9 MgCl<sub>2</sub> 6.9

表1. アミラーゼに対するさく酸塩と塩化物の安定性

塩の種類	pH (1M)	0M	<sup>-4</sup> 10M	<sup>-3</sup> 10M	<sup>-2</sup> 10M	0.1M	1.0M
Na-Ace	8.4	0	14	89	95	84	0
NaCl	6.1	0	0	19	34	8	0
K-Ace	7.1	0	0	5	14	0	0
KCl	5.9	0	0	0	0	0	0
Ca-Ace	7.7	0	55	95	95	64	22
CaCl <sub>2</sub>	8.7	0	11	87	95	95	0
Mg-Ace	7.8	0	5	5	0	0	0
MgCl <sub>2</sub>	6.9	0	0	0	0	0	0

アミラーゼの濃度：0.005%，保持温度：60°C，時間：60分

このことは、一般に酵素の試料溶液は高濃度となるほど溶液中の種々の物質との会合によって酵素の熱に対する安定性は増大するが、さく酸塩を添加するばあいもpH緩衝力の問題だけでなく、アミラーゼに対するさく酸イオンの会合性がClイオンより大きいからであろう。これは合成高分子電解質が相分離を生じる閾値が、さく酸イオンの存在ではClイオンのばあいより大となる<sup>2)</sup>ことからただちに推定される。

### 3.3 70°Cにおけるさく酸塩濃度の影響

図3は、アミラーゼの濃度を0.1%とし、これにさく酸塩を濃度を変えて添加し、70°Cに30分保持したのちの残存活性度である。

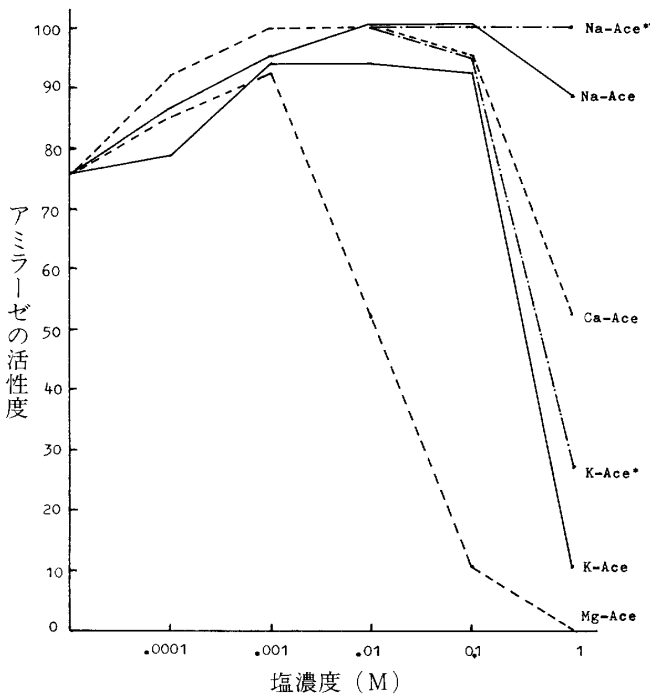


図3. 70°C 30分後に残存するアミラーゼ活性  
アミラーゼ：0.1%，溶液のpHは図1に同じ  
K-Ace\*, Na-Ace\*について10<sup>-3</sup>以下は略す

溶液を70°Cに保持すると、室温または60°Cのばあいと比較して、一般にアミラーゼの活性は著しく低下し、1M K-Ace (pH=7.1) と1M K-Ace\* (pH=7.8) では残存する活性度が図1のばあいとは逆になる。

これらの原因は、添加された金属イオンとアミラーゼの結合にもとづく活性低下のほか、アミラーゼの熱変性、添加されたイオンと必須金属イオンの平衡関係、試料溶液が高濃度となることによる見かけの活性低下などの負の面と、反面それらの原因による耐熱性の増大という、正負の要因が存在する結果によると考えられる。

## 4. K-AceとNa-Aceによる不可逆的阻害の比較

### 4.1 実験操作

3.1の室温における実験で、アミラーゼは0.01~1Mの濃度範囲でKおよびNa-Aceにより阻害されるが、これは塩の濃度に関して全く可逆的であって、室温における数時間内の操作で濃度変化にともなう不可逆性を見いだすことはできなかった。

しかしながら、3.3の実験結果にもとづいて、温度70°C 時間30分の条件で操作すれば、K-AceとNa-Aceのアミラーゼに対する不可逆的阻害を比較することが可能であった。以下にその実験操作を述べる。

10mlの目盛のついたA, B 2本の試験管に、つぎに示す順序でさく酸塩とアミラーゼを混合する。

A管……………1Mさく酸塩 5ml+10% $\alpha$ -アミラーゼ0.1ml

B管……………0.5M同さく酸塩10ml+10% $\alpha$ -アミラーゼ0.1ml

とし、A, B両試験管を70°Cに30分保持したのち、Aを水で10mlに稀釈し、A, B両管のアミラーゼ活性を比較する。このばあいアミラーゼおよび塩の濃度誤差は許容範囲にとどまる。

### 4.2 実験結果

#### 4.2.1 加熱しない10%アミラーゼについて

室温で水溶液とした10% $\alpha$ -アミラーゼを用いて、4.1の実験操作により、K-Ace, Na-Aceのアミラーゼに対する影響を検討した結果、下に表で示す数値を得た。

さく酸塩	pH (1M)	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	7.1	64	50	+14
K-Ace*	7.8	71	64	+7
Na-Ace	7.9	86(×10)	86(×10)	±0

表中、Na-Aceの欄に(×10)とあるのは、70°C、30分保持したのちに残存するアミラーゼの活性度が測定域の外にあるため、0.5M Na-Aceで10倍に希釈して測定したものである。またpHはすべて1M濃度における測定値であるが、K-Ace\*はKOHで、Na-AceはH-Aceによりそれぞれ微量の調整を行なった。

Na-AceではA、Bとも同じ活性度を示すのに対し、K-Aceでは1Mで保持するA管の方が0.5Mで保持するB管よりも、3.3で述べた原因により活性度が大きく残存する。しかし、これもpHが高くなると両者の差が縮小しているのが認められる。

#### 4.2.2 60°Cに48時間保持した10%アミラーゼについて

下記の表は4.2.1の10%α-アミラーゼを60°Cに48時間保持したのち(注。ここでpHは5.6から5.3に下る)、これを用いてK-AceとNa-Aceの影響を前と同じ操作によって比較したものである。

さく酸塩	pH (1M)	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	7.1	73	66	+7
K-Ace*	7.8	71	67	+4
Na-Ace	7.9	74(×10)	74(×10)	±0

Na-Aceではこのばあいも0.5M溶液で10倍に希釈して測定を行なったが、AとBに差は認められなかった。しかしアミラーゼの活性は、60°Cに48時間保持することによって低下している。

K-Aceでは、4.2.1と比較して残存する活性度はむしろ高い値を示すが、AとBの差が縮小するのが注目される。

#### 4.2.3 さらに酸性で保持した10%アミラーゼについて

下記の表は、4.2.2の60°Cに48時間保持した10%α-アミラーゼ10mlに0.1Nさく酸1mlを添加して、pHを5.3から4.9に低下させたのち、さらにこれを60°Cに18時間保持したもの(注。ここでpHは4.9から5.1に上る)を用い、前と同じ操作によってK-AceとNa-Aceの影響を比較したものである。

さく酸塩	pH (1M)	A管の活性度	B管の活性度	AとBの差
K-Ace	7.1	48	44	+4
K-Ace*	7.8	43	46	-3
Na-Ace	7.9	95	95	±0

アミラーゼの活性低下のため、Na-Aceにおける希釈はこのばあい必要がなかったが、K-Aceにおいても4.2.2と比較して活性が低下している。

Na-AceではこのばあいもAとBのあいだに差は生じないが、K-Ace(pH=7.1)においてはAとBの差が4.2.2よりもさらに縮小し、K-Ace\*(pH=7.8)にいたってAがBより低い活性度を示すようになる。

すなわち、ここではじめてK-Aceのα-アミラーゼに対する不可逆的阻害性がNa-Aceよりも強いことが、直接実証できたわけである。

## 5. 小 括

粗製α-アミラーゼIII-A型〔黒色粉末〕を使用し、3の予備実験ではK、Naさく酸塩の高濃度側での阻害性を検討し、この結果にもとづいて、4では加熱によりアミラーゼに変性ないしゆらぎが生じてくると、その程度に応じてK<sup>+</sup>はアミラーゼに結合し、その活性を不可逆的に阻害する性質がNa<sup>+</sup>より強いことを実験的に証明した。

## II. SIGMA社製 粗製α-アミラーゼIII-A型〔黄褐色粉末〕について

### 1. はじめに

#### 1.1 試薬について

さきのIで、アミラーゼに対するK<sup>+</sup>の不可逆的阻害性がNa<sup>+</sup>より強いことは、III-A型〔黒色粉末〕を微酸性で加熱変性させたばあいに、はじめて実証できることを述べたが、本稿IIでは、Iの1.1で説明したIII-A型〔黄褐色粉末〕を使用するばあいのK<sup>+</sup>の不可逆的阻害について述べる。

#### 1.2 アミラーゼ試料溶液の作成

本実験に使用した〔黄褐色粉末〕は水に対する溶解性が著しく小さいため、その1gをとって10ml水溶液とし、2日間低温に静置したのちその上澄の部分採取してアミラーゼ10%溶液とした。

〔黄褐色粉末〕は精製過程を経たと推定され、いくらかの変性が生じているが、上記の10%溶液も、このまま使用したのでは〔黒色粉末〕のばあいと同じく、K<sup>+</sup>の不可逆的阻害性がNa<sup>+</sup>より強いことを実証できなかった。

しかし、この10%溶液は、60°Cに25時間保持すれば、それだけで容易にK<sup>+</sup>の不可逆的阻害を証明できるようになる。したがって以下に述べる実験では、すべて60°Cに25時間保持した10%溶液(注.ここでpHは6.3から5.6に下る)を試料溶液とした。

なお、アミラーゼ活性の測定法および活性度の表わし方はIの2にしたがった。

## 2. さく酸塩の濃度とアミラーゼ活性

図4は0~1MのNa, K, Ca, Mg各さく酸塩水溶液10mlに上記の10%試料溶液0.1mlを添加し、60°Cに30分保持したのち残存するアミラーゼ活性を測定したものであり、図5は70°Cに30分保持したのちの活性度である。

図5を図4,図3と比較すると、このアミラーゼは70°Cにおいてさく酸塩の低濃度側で熱に対して著しく不安定であり、また高濃度側ではpHの影響をあまり受けないことが解る。

## 3. K-AceとNa-Aceによる不可逆的阻害の比較

### 3.1 実験操作

さきの2で指摘したように、このアミラーゼはさく酸塩の低濃度側で、熱に対する安定性がきわめて低いことから、高濃度側においては、アミラーゼと金属イオンの結合による影響の方が、アミラーゼ自体の濃度変化による影響を大きく上廻ると考えられる。したがって、この

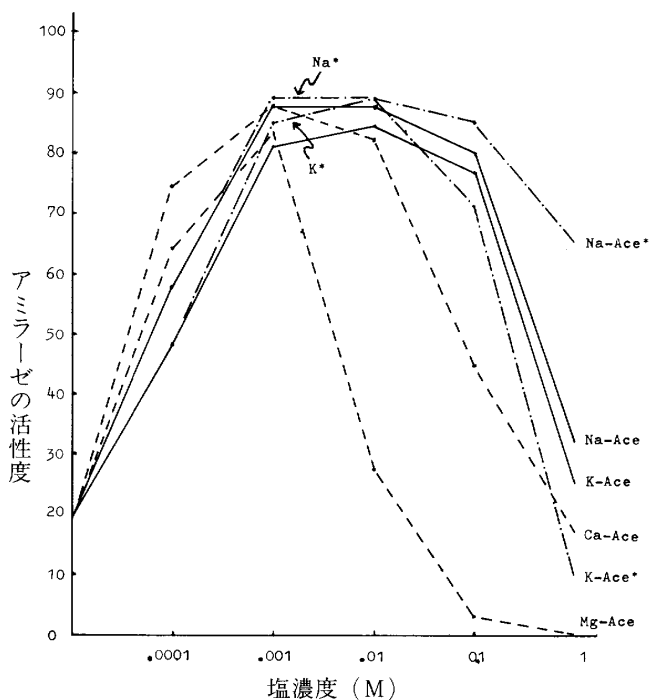


図4. 60°C30分後に残存するアミラーゼ活性  
アミラーゼ: 0.1%  
1MのpH: Na-Ace 8.4 K-Ace 7.1 Ca-Ace 7.6  
Na-Ace\*7.4 K-Ace\*7.8 Mg-Ace 7.8

ばあいは次に述べるようにIの4.1の5倍のスケールで操作を行なった。すなわち、

10mlの目盛のついたC, D 2本の試験管および小試験管を用意し、つぎの順序でさく酸塩と試料溶液を混合する。

小試験管…… 1M(または0.1M) さく酸塩 2ml  
+10%試料溶液0.2ml

D 管……水10ml+1M(または0.1M)同さく酸塩 1ml+10%試料溶液0.1ml

両試験管を70°Cに30分保持したのち、小試験管から1mlをC管に採取し、水で10mlに稀釈したのち、C, D両管の活性度を比較する。このばあいアミラーゼおよびさく酸塩の濃度誤差は許容範囲にとどまる。

### 3.2 実験結果

#### 3.2.1 1M~0.1Mの濃度変化によるK<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>およびCa<sup>++</sup>の不可逆的阻害

3.1の実験操作により、K, NaおよびCa-Aceを用いて1M~0.1Mの濃度変化における残存アミラーゼ活性を比較した結果は下の表のようになる。

さく酸塩	pH (1M)	C管の活性度	D管の活性度	CとDの差
K-Ace	7.1	12	27	-15
Na-Ace	8.4	60	72	-12
Ca-Ace	7.7	3	14	-11

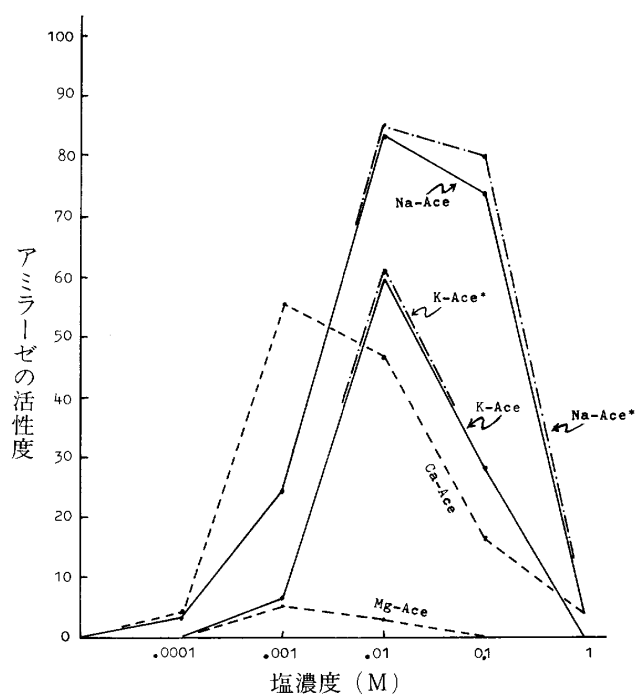


図5. 70°C30分後に残存するアミラーゼ活性  
アミラーゼ: 0.1%  
溶液のpHは図4に同じ  
K-AceとK-Ace\*の折線は一致する

すなわち、Iの〔黒色粉末〕のばあいは1M~0.5Mの濃度変化においても、不可逆的阻害は容易に現われなかったのに対し、このアミラーゼでは1M~0.1Mの濃度変化でCとDの差は3者とも負の値を示す。

### 3.2.2 0.1M~0.01Mの濃度変化によるK<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>およびCa<sup>++</sup>の不可逆的阻害

3.2.1につづいて、各さく酸塩の濃度を0.1M~0.01Mの間で操作すると、下の表で示すような結果となる。

さく酸塩	pH (1M)	C管の活性度	D管の活性度	CとDの差
K-Ace	7.1	51	58	-7
Na-Ace	8.4	87	84	+3
Ca-Ace	7.7	47	41	+6

すなわち、ここでNaおよびCa-AceについてはCとDの差が正に轉じるのに対して、K-Aceでは-7であり、K<sup>+</sup>がNa<sup>+</sup>およびCa<sup>++</sup>よりもアミラーゼに対する不可逆的阻害性の強いことを直接証明できたと考えられる。またCa<sup>++</sup>の阻害性は図5ではK<sup>+</sup>より大であるにもかかわらず、この濃度範囲では不可逆性を示さないことは注目される。

### 3.2.3 必須金属イオンCa<sup>++</sup>に対する検討

上記のK-Ace、Na-Aceによる各実験においては、つねに液中に0.01M以上のこれらさく酸塩が存在するのであるから、そのため必須金属イオンであるCa<sup>++</sup>がアミラーゼから解離することが考えられる。

そこで、液中につねに0.01MのCa<sup>++</sup>が存在する状態にして検討した結果を下に表で示す。すなわち、3.1の実験操作で1M K-Aceのかわりに1M K-Ace、0.01M Ca-Ace混合溶液を、1M Na-Aceのかわりに1M Na-Ace、0.01M Ca-Ace混合溶液を使用し、C、D両管に使用する水のかわりに0.01M Ca-Aceを用いたものである。

塩溶液の組成	C管の活性度	D管の活性度	CとDの差
1M K-Ace 0.01M Ca-Ace	62	75	-13
1M Na-Ace 0.01M Ca-Ace	72	74	-2

表の値から、Ca<sup>++</sup>を添加しない状態で操作した3.2.1と比較して残存活性度はいづれも大となるが、CとDの差からここでもK-Aceの方がNa-Aceより阻害的であ

ることが解る。

### 3.2.4 アミラーゼの濃度と熱に対する安定性の検討

3.2.1、3.2.2の実験結果からCとDの差が負になることで、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>による不可逆的阻害が存在することは明らかであるが、これらの実験操作でC管の前段階である小試験管とD管のなかのさく酸塩濃度を等しくしておけば、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>による阻害は現われず、かわって試料濃度の差にもとづくアミラーゼの熱に対する安定性だけが現われるはずである。

下に示す表は、この検討のためにつぎの実験操作によって得られたものである。すなわち、

小試験管……0.1Mさく酸塩 2 ml+10%試料溶液  
0.2ml

D 管……水10ml+1M同さく酸塩 1 ml  
+10%試料溶液0.1ml

とし、両管を70°Cに30分保持したのち、小試験管から1 mlをC管に移し、水のかわりに1/11Mの同じさく酸塩溶液で10mlに稀釈し、CとDの活性度を比較する。

さく酸塩	pH (1M)	C管の活性度	D管の活性度	CとDの差
K-Ace	7.1	47	22	+25
Na-Ace	8.4	78	72	+6
Ca-Ace	7.7	12	12	±0

表のCとDの差は、予想どおりいづれも正であり、アミラーゼがD管に対して10倍の濃度である小試験管中では、熱に対する安定性がいかに大きいか解る。したがって3.2.2で得られた0.1M~0.01Mの濃度変化におけるK-Aceの不可逆的阻害は、アミラーゼが高濃度であることによる安定性を上廻って現われたものである。

## 4. おわりに

さく酸塩はK、Naさく酸塩とも0.01M以上の高濃度側で、アミラーゼに対して阻害性を示すが、これには可逆的な部分と不可逆的な部分が存在する。

この濃度変化にもとづく不可逆的阻害性の部分だけを、直接に実験値によって証明するには、一方にアミラーゼの濃度と熱に対する安定性の関係という相反する条件があるため、変性の程度、保持する温度、添加する塩の濃度などの条件を適当に設定しなければならなかった。

本稿IIでは、すでに製品の段階でやや変性を受けているIII-A型〔黄褐色粉末〕を、さらに10%で60°Cに25時間保持したものを試料とし、70°Cの温度と、さく酸塩の

濃度を0.1M~0.01Mの範囲で操作することにより、K<sup>+</sup>がNa<sup>+</sup>やCa<sup>++</sup>に比較して最も強い不可逆的阻害を示すことを証明できた。

### 第1編総括

自然における個体ないし細胞の加齢<sup>3)</sup>が分子レベルから演繹できるものとするれば、それは生物活性をもつ高分子電解質の熱変性ないしゆらぎか、または狭義、広義の酸化にもとづくものであろうとの仮説が成立する。

本実験は、下の表に示されているように、つねに0.1M程度の濃度で細胞内に存在するKイオンに関して、それが新陳代謝の動的平衡のうえにあるとはいえ、これと $\alpha$ -アミラーゼの結合によって生じる不可逆的な活性低下を、上記の仮説に対して検討したものである。<sup>4)</sup>

細胞内外のイオン濃度

	イカ巨大神経		ネズミ骨格筋	
	細胞内液 mM/Kg H <sub>2</sub> O	血液 mM/Kg H <sub>2</sub> O	細胞内液 mM/Kg H <sub>2</sub> O	血液 mM/Kg H <sub>2</sub> O
K	400	20	152	6.4
Na	50	440	16	150
Ca	0.4	10	1.9	3.4
Mg	10	54	16.1	1.6
Cl	40	560	5.0	119

小谷正雄ほか：分子生物学：P332，朝倉，1963より

すなわち、アルカリ金属および土類金属イオンの必須性や熱に対する安定性の正の面は措いて、高濃度側の阻害性を酵素の活性度から直接測定し、結果としてK-Aceはアミラーゼの熱変性にともなうて、Na-Aceよりも強い不可逆的阻害を示すことが証明された。

アルカリ金属イオンの酵素に対する結合は、一般的に酵素の分子容の増大、<sup>5)</sup>水に対する溶解性の増大など、細胞の膨潤の方向を意味するが、結論として、生物活性をもつ高分子電解質の分子レベルに、生命現象の過程において、熱変性および広義の酸化による一方的な劣化の方向が存在することを示唆するものと考ええる。

### 参考文献

- 1) 鷲塚 靖，井村洋一：脈流によるゾーリムシの細胞賦活に関する実験的研究，大分県立芸術短期大学紀要第5巻：P. 43，1966.
- 2) 高橋 彰：高分子電解質溶液の相分離，生物物理 Vol. 14, No. 4 : p. 148, 1974.
- 3) 江上信雄，能村哲郎共訳：動物の老化のしくみ，丸善，東京，1974.
- 4) 井村洋一，辻 秀男： $\alpha$ -アミラーゼ活性に対するK, Na, Ca, Mgの影響，温研報Vol. 27, No. 2 : P. 98, 1975.
- 5) 江橋節郎：タンパク質とイオンの相互作用(II)，化学増刊37：P. 163，化学同人，京都，1968.