

Amylose と炭化水素鎖の相互作用

—Amylose の Affinity Chromatography による分画への応用—

中 森 裕 子*, 井 上 恭 子*
柴 田 陽 子*, 山 崎 喜 美 江*

Interaction of Amylose with Hydrocarbon chain —Its Possible Application for Fractionation of Amylose by Affinity Chromatography—

Hiroko Nakamori, Kyoko Inoue
Yoko Shibata and Kimie Yamasaki

I 諸 言

Amyloseの溶液物性についての研究には、なお問題が多く残されている。それは Amylose の難溶性に起因しており、従って厳密な Amylose 分子量の分画法も確立されていない。

水溶液中で Amylose はグルコース残基6ケ (7あるいは8ケ) で1回転する helix 構造を保ち溶解している¹⁾。helix 内部は、従来は -CHグループが局在する疎水領域を形成し、それが脂肪酸やSDSの疎水性物質包接化の要因であると考えられていた。しかし、NMRスペクトルの解析、X線回折などから、-CHグループだけが helix 内壁表面を占めるのは構造的に不可能であり、グルコシド結合の酸素も helix 内壁に位置していることが明らかにされた²⁾。これら二つの拮抗的な影響下において、Amyloseは疎水的性質と親水的性質を helix 内に合わせ持っていることになる。最近、われわれはSDSと親水性の Bio-Gel との相互作用において、その非特異的結合の原因が Bio-Gel 内の高度にかつ協調的に水和された水に基づくことを明らかにした。その結合は、さらに多数のOH基を持つ Sephadex-Gel において顕著に見られた。水と水中では水の構造が普通の自由水とは異なり水分子同志が強く水素結合しているため、ice berg 形成が抑えられ、その結果疎水性自由エネルギーを増加させずに水不溶

の疎水性物質をも溶解することが出来ると考えられる^{3~5)}。

以上のことより、Amylose helix 内の水和水と疎水性炭化水素鎖との相互反応が期待され、事実、これまでに Amylose-SDS 複合体は4 M尿素存在下でゲル電気泳動⁶⁾、アセテート膜電気泳動⁷⁾を可能にした。

本研究では Amylose と炭化水素鎖の反応を解析し、疎水性物質包接化の機構について調べるとともに、Affinity Chromatography への応用で、これまで不十分であった高分子の Amylose 画分の有効な分離方法を検討することを目的とした。

II 実験方法

1. 試料および試料の調製

Amylose 試料として次の4種類のものを用いた。

Amylose A (半井化学, 特級, 表示 M.W. 2,900)

Amylose B (/ / / 16,000)

Amylose from Potato I (SIGMA)

Amylose from Potato II (/)

他の試薬は市販特級試薬を使用した。

Amylose試料の調製は次の通りである。各 Amylose 試料約 0.1~0.25g を0°C、氷水中でガラス棒で激しく攪拌しながら 1N KOH 1ml に溶解し、直ちに Buffer で10倍に希釈する。その溶液を10倍量の Buffer に一夜透析する。ただし Amylose A についてはその適量が煮沸することにより直接 Buffer に溶けるため、

* 生物化学研究室 (Biochemical Laboratory)

煮沸溶解後用いた。使用した Buffer は、(1)過ヨウ素酸化法では0.5あるいは4Mのエチル尿素を含むM/5炭酸 Buffer (pH9.2), (2)平衡透析法では4M尿素を含む Tris-glycine Buffer (pH8.6), (3) pH8.0における Affinity Chromatography ではエチル尿素を含む Tris-HCl Buffer (pH8.0) を使用した。また(4)pH12と pH 8.4の Affinity Chromatography および Batch 法においては、1N NaOH に同様に溶解した試料を Sphrensen glycine II Buffer で pH12 あるいは pH8.4 に調整後使用した。

2. 操作

(1) 過ヨウ素酸化法による分子量の測定⁹⁾

まず Amylose 試料の正確な分子量を知るために、Amylose 還元末端基を利用して Amylose の重合度を求め、数平均分子量を計算した。

Amylose 溶液を水素化ホウ素ナトリウムで還元し、次いで過ヨウ素酸ナトリウムで酸化する。酸化生成物であるホルムアルデヒドをクロモトローブ酸と反応させ、その発色液を比色する。予め作成した検量線よりホルムアルデヒドを定量し、分子量を計算により求めた。

(2) 平衡透析法

最近鹿谷は⁹⁾、4M尿素存在下における SDS と Amylose の結合について、結合定数 K と分子の大きさのパラメーターである溶出溶積 $\frac{V_g}{V_0}$ の間には正の相関関係があることを報告した。ここでは分子量と K の定量的な関係を確立するため、分子量既知の Amylose I, II と比較的分子量の B を選び、SDS との結合定数 K, 結合サイト数 n を求めた。

0.25% の各 Amylose 溶液 1ml を透析チューブ (Visking Cellulose Tube, 直径 0.6cm, 1/2巾 1.0cm) に入れ、500 μ M から 50 μ M の各 SDS 溶液 2.5ml に対して 40°C で 7 日間透析を行なう。平衡到達後、内液と外液の SDS 濃度を定量した。また同時に内液の Amylose 濃度を測定し、その希釈率から体積変化量を求め補正した。SDS の定量は Epton 法の改良法¹⁰⁾、Amylose の定量はフェノール硫酸法によって行なった。

(3) Batch 法による Amylose と Octyl 基の結合パラメーターの測定

Amylose と SDS の結合定数 K は分子量と共に増大することが知られている。炭化水素鎖である Octyl 基を有する Octyl Sepharose CL-4B においても同様な相互反応が起こると予想され、Amylose helix と Octyl 基との親和性の強さに基づく Affinity Chromatography

への応用が考えられる。そこで先に Octyl 基との結合について調べるために、pH12 で Batch 法を行なった。

Octyl 基の場合、4M尿素存在下では Amylose と結合しないことがわかったので、尿素存在下で Amylose の Octyl ゲルに対する分配係数 K_{AV}^u を求めた。10ml のメスシリンダーに Octyl Sepharose CL-4B を 6ml ほど詰め、4時間安定させる。うわずみを除いた後、Amylose A あるいは B 溶液を 2ml 入れ、4M になるように尿素を加える。Buffer で 10ml に標定し、転倒混和する。2時間後うわずみをガラスフィルター 3G-3 でろ過し、そのろ液の Amylose 濃度をフェノール硫酸法によって定量する。この場合の K_{AV}^u は次式で表わすことが出来る。

$$K_{AV}^u = \frac{\left(\frac{m_G^u}{V_G^u}\right)}{\left(\frac{m_0^u}{V_0^u}\right)} = \frac{(\bar{m} - m_0^u)}{\left(\frac{m_0^u}{V_0^u}\right)} \quad \text{---(1)}$$

m_G : ゲル相における溶質のモル数
 m_0 : 溶媒相における \times
 \bar{m} : 最初に加えた \times
 V_G : ゲルが占める容積
 V_0 : 溶媒が \times

同時に尿素が存在しない時の見かけの K_{AV}^{app} を測定した。

$$K_{AV}^{app} = \frac{\left(\frac{m_G + m_b}{V_G}\right)}{\left(\frac{m_0}{V_0}\right)} = \frac{\left(\frac{m_G}{V_G}\right)}{\left(\frac{m_0}{V_0}\right)} + \frac{\left(\frac{m_b}{V_G}\right)}{\left(\frac{m_0}{V_0}\right)} \quad \text{---(2)}$$

m_b : ゲルに結合した溶質のモル数

ここで $\frac{\left(\frac{m_G^u}{V_G^u}\right)}{\left(\frac{m_0^u}{V_0^u}\right)} = \frac{\left(\frac{m_G}{V_G}\right)}{\left(\frac{m_0}{V_0}\right)}$ であり、(1), (2)式より

$$\left(\frac{m_b}{V_G}\right) = (K_{AV}^{app} - K_{AV}^u) \left(\frac{m_0}{V_0}\right) \quad \text{---(3)}$$

式(3)が導かれる。Octyl ゲル 1ml 当りに結合している Amylose 量 $\left(\frac{m_b}{V_G}\right)$ を求めるため、Amylose 試料の濃度をそれぞれ変化させ (A 0.005%~0.15%, B 0.005~0.07%), 同様にして溶媒相における平衡濃度を測定した。実験は 23°C と 40°C で行なった。

なお計算に必要な V_G は、Blue Dextran が Octyl ゲルに吸着して測定不可能であったので、構造がよく似ている Sepharose 4B の値を用いた。

(4) Affinity Chromatography による Amylose の分画

Amylose は pH12 で Octyl 基と結合し、数時間安定な溶液として存在する。Amylose を Octyl 基との結合

の強さに基づき分離するため、pH12で尿素勾配溶出を行なった。Octyl Sepharose CL-4Bを充填したカラム(1.8×23.5cm)に0.05% Amylose 溶液2mlを流した後、gradient mixerで0から8Mの尿素勾配溶出を行なう。流速は12ml/時に保ち、フラクションコレクターにて2mlずつ集めた。溶出パターン測定はフェノール硫酸法で行なった。同様に40°Cにおいても行なった。

AmyloseのpKは12.7付近であり、pH12で実験を行なうことはhelixの崩壊、沈殿(老化)などの変性を起こす恐れがある。従って実験は中性付近で行なう方がより望ましいので、Sørensen glycine II BufferをpH8.4に調整し、同じカラムを用いて試みた。一方、エチル尿素中でAmyloseはより安定な溶液を形成することがわかったので、0.5Mエチル尿素を含むTris-HCl Buffer(pH8.0)中で次のように実験した。カラム(1.8×35cm)に0.01% Amylose 溶液3mlを流し、流速は9ml/時で0.5から4Mのエチル尿素勾配溶出を行なう。

(5) Amyloseおよびオクチルアルコールの溶解度測定

一般に疎水結合切断試薬であると言われている尿素あるいはエチル尿素のhelixに及ぼす作用を明らかにすることは、helixと炭化水素鎖の結合を考える上で大変興味深い。

Octyl基のモデル物質としてオクチルアルコールを選び、Amyloseと共に水とエチル尿素水溶液に対する溶解度を測定した。Amyloseの溶解度測定はAmylose II 75mgを氷水中で1N KOH 1mlに溶解し、5倍に希釈する。室温で各溶媒(1Mエチル尿素, 2Mエチル尿素, 水)に透析する。pHを8.0に調整後、実験温度(10°, 20°, 40°C)で攪拌する。日を追ってその一部を取り、遠心して沈殿を除き、上澄のAmylose濃度をフェノール硫酸法によって定量し、溶解量を測定した。一方、25mlの各溶媒中にオクチルアルコールを順次添加していき、添加重量を測定しておく。室温で48時間振とう後、遠心し、下層部の溶液をガスクロマトグラフィー(G.L.C)で測定する。予め同条件で作成した検量線よりオクチルアルコールの溶解量を求めた。

III 結 果

表1は過ヨウ素酸化法により測定された各Amylose試料の分子量である。Amyloseの分子量測定、および他の実験において常に問題になったのは、その溶解度が小さいことである。過ヨウ素酸化の場合もA

表1 過ヨウ素酸化法により求めた Amylose の数平均分子量

Sample	M. W.
Amylose A	3,400
Amylose B	14,000
Amylose from Potato I	84,000
Amylose from Potato II	61,000

を除く各試料は、Amyloseを溶解させるのに効果的な働きをすると考えられるエチル尿素を含むBufferにも極めて低濃度にしか溶解しなかった。特にAmylose I, IIは分子量が大きく末端鎖から生成されるホルムアルデヒド量が少ないため、吸光度が極めて低い値となり、誤差が大きくなったと思われる。

AmyloseとSDSの結合様式は、一般に $A + nS \rightleftharpoons AS_n$ ($n=1, 2, \dots, n$)で表わされる。Langmuirの結合等温式により平衡透析の測定値を逆数プロット(γ^{-1} vs S^{-1})した(図1)。 γ はA(Amylose)1g当りに結合したSDSのモル数、Sは遊離型で存在するSDSのモル濃度を表わす。図1で直線は $\frac{1}{\gamma} = \frac{1}{nKS} + \frac{1}{n}$ で示され、y軸切点よりnを、傾きからKを求めた。表2に示すよ

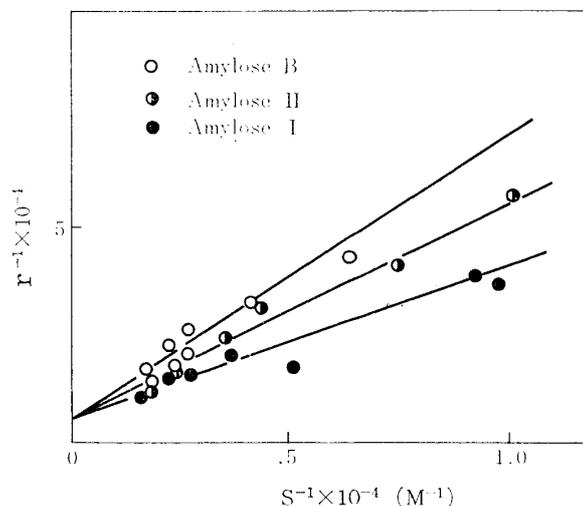


図1 Amylose と SDS の結合等温線
r: Amylose 1g 当りに結合している SDS のモル数; s: 遊離の SDS 濃度

表2 Amylose と SDS の結合パラメーター

Sample	M. W.	n(moles/g)	K(M ⁻¹)
Amylose B	14,000	2.00×10^{-4}	1.53×10^3
〃 II	61,000	2.00×10^{-4}	2.00×10^3
〃 I	84,000	2.00×10^{-4}	2.76×10^3

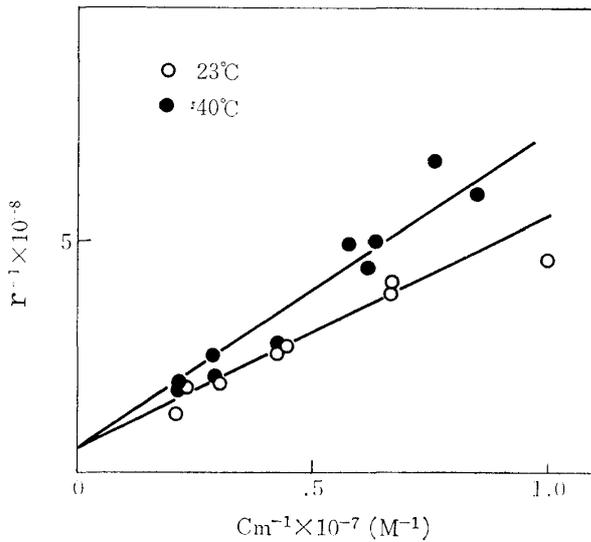


図2 Amylose と Octyl 基の結合等温線

r : Octyl ゲル 1ml 当りに結合している Amylose のモル数 $\left(\frac{m_b}{V_G}\right)$; C_m : 遊離の Amylose 濃度 $\left(\frac{m_0}{V_0}\right)$

うに、各 Amylose 1g 当りの結合サイト数 n は 2.00×10^{-4} (moles/g) とすべて等しくなった。一方、結合定数 K は分子量と共に大きくなっている。このことは、分子量の大きい Amylose の方が SDS と強く結合していることを表わしている。

Octyl 基との結合においても同様のことが予想され、それを Batch 法で確かめてみた。Amylose A は尿素の存在にかかわらず K_{AV} が等しいことから、Octyl 基との結合がないと言える。結合の見られる B について Langmuir の結合等温式により逆数プロットすると、図2のようになった。これより n , K を求めると、 $n = 2.9 \times 10^{-8}$ (moles/ml), $K = 5.0 \times 10^7 (M^{-1})$ (23°C), $7.0 \times 10^7 (M^{-1})$ (40°C) となった。結合パラメーターの計算は、式 $\Delta F^\circ = -RT \ln K$ より標準自由エネルギー変化量 ΔF° を求め、エンタルピー変化量 ΔH° は温度依存性が低いと仮定し、van't Hoff の式より概算した。エントロピー変化量 ΔS° は式 $\Delta F^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$ より求めた。表3に示すように、 $\Delta H^\circ > 0$, $\Delta S^\circ > 0$ より疎水結合が重要な要因であると考えられる。

Octyl Sepharose CL-4B の疎水結合クロマトグラフィーによる分画を試みたところ、結果は図3-(1)に見ら

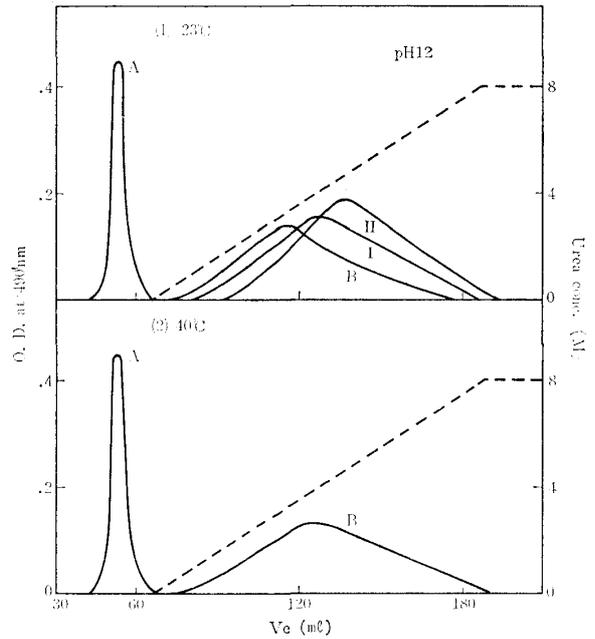


図3 pH12 における Octyl Sepharose CL-4B による Amylose A, B, I, II の疎水結合クロマトグラフィー

尿素勾配溶出 (0→8M); カラム: 1.8×23 cm; 流速 12ml/時

れるように pH12 で Amylose B, I, II はそれぞれ Octyl 基との結合が見られ、尿素勾配により結合の弱い低分子量のものから順に溶出された。しかし、Amylose A は尿素存在下における V_e と等しい溶出容積を示し、Octyl 基との結合がないことを示している。これは Batch 法の結果と一致している。従って、Amylose A の helix 鎖が短い為に Octyl 基を包接化せず、単なるゲル透過の機構により溶出したものと考えられる。ここで分子量 M と溶出容積 V_e は比例関係を示さず、分子量が大きくなるに従って結合の分子量依存度が少なくなって来ている。また図3-(2)は40°Cで同様に行なった結果であり、温度上昇に伴ない Octyl 基との結合が強くなり溶出が遅れている。このことは Batch 法の結果と一致し、この結合が疎水結合性のものであると考えられる。同様に pH を 8.4 に下げて試みたところ、B, I, II の溶出が全体に遅れ、三試料がほぼ等しい溶出容積を示した(図4)。pH 8.4 では分子量の大きさによる Octyl 基との結合の強さにあまり差が見られなくな

表3 Amylose と Octyl 基の結合パラメーター

Temp.	n (moles/g)	$K(M^{-1})$	ΔF° (kcal/mole)	ΔH° (kcal/mole)	ΔS° (e.u.)
23°C	2.9×10^{-8}	5.0×10^7	-10.6	4.8	51.3
40°C	2.9×10^{-8}	7.0×10^7	-11.2		51.3

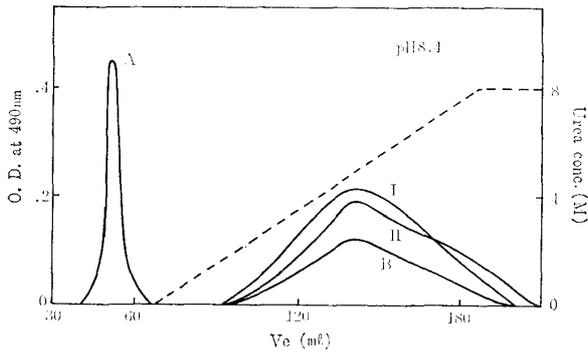


図4 pH8.4における Octyl Sepharose CL-4B による疎水結合クロマトグラフィー

る結果、分離が悪くなるものと考えられる。一方、pH8.0, 0.5Mのエチル尿素を含む Buffer 中で0.5から4Mのエチル尿素勾配溶出を行ない分画を試みたところ、エチル尿素の存在下では Octyl基との結合がなく、各 Amylose はゲル透過の機構に従って溶出された(図5)。これは0.5Mの低濃度ではあってもエチル尿素が水の構造を変化させ、疎水性自由エネルギー駆動過程である Amylose の Octyl 基への結合を妨げる働きをしているのではないかと考えられる。

表4 Amylose の飽和溶解量 (mg/g)

溶媒	温度	40°C	20°C	10°C
H ₂ O		1.68	1.18	0.70
1M E.U.		3.62	2.98	2.37
2M E.U.		7.88	4.63	—

E.U.=エチル尿素

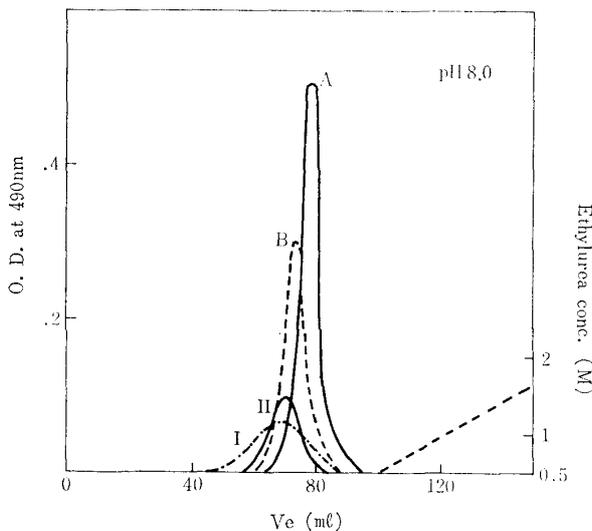


図5 pH8における Amylose A, B, I, II のエチル尿素勾配溶出による溶出パターン
カラム: 1.8×35cm; 流速 9ml/時

表5 Amylose の水からエチル尿素 (2M) 溶媒への移行に伴う標準自由エネルギー変化, エンタルピー変化, エントロピー変化量 (グルコース残基 1mole 当り)

Temp.	$\Delta\mu^\circ$ (cal/mole)	ΔH° (cal/mole)	ΔS° (e.u.)
40°C	-1,050	1,320	7.6
20°C	-900		7.6

そこでエチル尿素の Amylose helix に与える影響を調べるために、Amylose とオクチルアルコールの水およびエチル尿素水溶液に対する溶解度を測定した。Amylose の難溶性のために、特に水においてやや再現性を欠く結果となったが、表4で明らかなように、エチル尿素水溶液に対する溶解量は水に比べ非常に大きく、エチル尿素濃度、温度と共に増加する。これより水からエチル尿素 (2M) 溶液への移行の自由エネルギー変化量 $\Delta\mu^\circ$ を求めると、 $\Delta\mu^\circ < 0$ となった(表5)。一方、オクチルアルコールの溶解度は、添加したオクチルアルコールが一定量以上になると G.L.C 値がプラトーに達するので、その点を飽和溶解度とした。飽和溶解量からオクチルアルコールの水からエチル尿素 (2M) 溶液への移行に伴う自由エネルギー変化量 $\Delta\mu^\circ$ を求めると、Amylose と同様に負になった(表6)。従って、エチル尿素は、Amylose の helix を水中よりも安定に保ち、また水の構造を変え ice berg 形成を抑えるために、オクチルアルコールの溶解度を増すものと考えられる。

表6 オクチルアルコールの溶解量および水からエチル尿素 (2M) 溶液への移行に伴う標準自由エネルギー変化量

溶媒	溶解量(mg/g)	$\Delta\mu^\circ$ (cal/mole)
H ₂ O	0.704	-624
2M E.U.	1.679	

E.U.=エチル尿素

IV 考 察

Amylose は 4M 尿素存在下で SDS と結合し安定な包接化合物を作るが、Amylose 包接化機構についてはまだ不明な点が多い。

蛋白質と SDS の結合については、一般に、両者にイオン結合が起こり、次いでタンパク鎖が広がったために水と接した疎水性部分に SDS がミセル状に取り込まれるというモデル¹⁾ が広く支持されているが、そのモデルからは電荷を持たない Amylose の SDS 複合体形

成についての説明は出来ない。最近われわれが提出した水和水の疎水性物質溶解モデル^{3~5)}をもとに, Amylose helix の疎水性物質包接化の機構を水和水の観点から考えてみた。

溶液中の Amylose の存在状態については諸説があるが, 分子内水素結合 (C-2, C'-3 間) により安定な helix 構造をとっていると考えられる。そして helix 内は酸素原子の強い極性により, 水が強く水和された状態にある。水和水は普通の水に比べ ice berg 形成が抑えられるために, 疎水性物質を溶解することが出来ると思われる。Batch 法の結果は, Amylose と Octyl 基が結合しその結合が SDS の場合と同じく疎水結合性であることを明らかにした(表 3)。SDS との結合において Amylose 1g 当りの結合サイト数 n は 2.00×10^{-4} (moles/g) で分子量にかかわらず一定であったが, 結合定数 K は分子量が増すに従って大きくなった(表 2)。また, Octyl Sepharose CL-4B による Affinity Chromatography (pH12) においても図 3-(1) に見られるように Octyl 基との結合は分子量と共に大きくなっている。これは helix 内における水和水の形成が高分子 Amylose の方が強いことを示している。Szejtli ら¹²⁾ は Amylose の構造について, かなり長い helix のセグメントの間に random coil が介在し, 分子に柔軟性を与えているというモデルを提出している。低分子の Amylose (およそ Amylose B 位以下のもの) はエントロピー的に 1 本の硬い helix 棒として存在することが許されるが, 高分子のものについてはその分子量の大きさにかかわらず helix のセグメントの重合度が 100~120 の値になり, helix 鎖の限界を示唆した。helix は常に生成消滅を繰り返しており, 確率的には大きな分子のものほど長い helix を形成し, 水和水形成能力も高いと考えられるが, helix の長さには限界がある。Octyl Sepharose CL-4B による分画 (pH12) で分子量が大きくなるほど分離能が落ちるのは, helix の長さには限界があることによるものであろう。また SDS のラウリル基に比べ Octyl 基が短鎖であるために, Amylose との結合が弱いということも考えられる。従って, Octyl 基より長い炭化水素鎖を持つゲルでの分画では分離能が向上するものと予想される。一方, pH12 に比べ pH8.4 で分離が悪くなった原因としては, 次のことが考えられる。すなわち低い pH では helix はより安定化するが, 反面, Octyl 基との結合力の分子量依存性が小さくなり, 従って各 Amylose の分離が悪くなるものと考えられる。

Amylose の溶解度測定からも明らかのように, 尿素

あるいはエチル尿素は, helix を安定にし溶解度を高める。Amylose の溶媒についての種々の実験から DMSO (dimethyl sulfoxide) が良溶媒であると言われているが¹²⁾, その helix 安定化の要因は, DMSO が helix を形成している隣接水酸基間の水素結合を強めるためであった。従って, 双極子モーメントを持つ尿素は DMSO と同様に Amylose の C-2 あるいは C'-3 の水酸基と結合することにより, その間の水素結合を強め helix を安定に保つのであろう。その作用は表 4 で示されるように溶媒濃度が高い方が大きい。従って, 尿素が存在すると helix は安定であるが, 尿素が helix 内の水分子とも結合することによって水和が妨げられ, Octyl 基の包接化も妨げられると考えられる。Octyl Sepharose CL-4B によるクロマトグラフィーにおいて尿素勾配溶出を行なうと, Octyl 基と結合していた Amylose が溶出されるのは, 尿素が Amylose helix 内に侵入し水の構造を変えるために Octyl 基との結合が弱められるからであろう。エチル尿素の場合その構造から尿素より大きい極性を持つため, 炭化水素鎖の包接化を弱める効果は更に大きくなると考えられる。このことは, オクチルアルコールのエチル尿素への溶解が水に比べ非常に大きい事実によっても支持される。

V 要 約

Amylose の helix 内の水は強く水和され, 普通の水に比べ ice berg 形成が抑えられるため, helix 内へ SDS, Octyl 基など疎水性物質を包接することが出来る。それは疎水的水和現象に基づく疎水性自由エネルギー支配の過程である。

Amylose は helix の状態で溶解し, グルコース残基の隣接水酸基 (C-2, C'-3) 間の水素結合により安定化されると考えられているが, 尿素, エチル尿素はその水素結合を強めることによって, Amylose をより安定な溶液とする。従って Amylose の良溶媒であるが, helix 内の水和力を弱め, 炭化水素の包接化を阻害することになる。

Amylose の分子量による分画手段として, Octyl Sepharose CL-4B による Affinity Chromatography は有効ではあるが, 実験条件をさらに検討する必要がある。また, ゲルの炭化水素鎖を伸ばすことによって, 分離は良くなると考えられる。

最後に, 本実験にあたり御指導下さいました謝名堂昌信教授に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Rundle, E.R., French, D.,: J. Am. Chem. Soc., **65**, 1707 (1943), Rundle, E.R., Edwards, C.F.,: J. Am. Chem. Soc., **65**, 2200 (1943)
- 2) 久下喬: 表面, **10**, No.7, 422 (1972)
- 3) Janado, M., Nakayama, R., Yano, Y., Nakamori, H.,: J. Biochem., **86**, 795 (1975)
- 4) Janado, M., Takenaka, K., Nakamori, H., Yano, Y.,: J. Biochem., 印刷中
- 5) Janado, M., Yano, Y., Nakamori, H., Nishida, T.,: J. Chromatog., 投稿中
- 6) Nishimura, N., Janado, M.,: J. Biochem., **77**, 421-426 (1975)
- 7) Shimada, M., Kido, S., Janado, M.,: Anal. Biochem., **72**, 664-668 (1976)
- 8) Hay, W.G., Lewis, A.B., Smith, F., Unrau, M.A.,: Methods in Carbohydrate Chemistry, (Academic Press) **5**, 365 (1965)
- 9) 鹿谷有子: 京都女子大学食物学科卒業論文 (昭和51年度)
- 10) 辻井薫, 高木俊夫: 蛋白質 核酸 酵素, **19**, No.9, 49
- 11) Shirahama, K., Tsujii, K., Takagi, T.,: J. Biochem., **75**, 309-319 (1974)
- 12) Erlander, R., Stig, Tobin, R.,: Die Makromolekulare Chemie **111**, 194-211 (1968)