

魚介類由来の生理活性ペプチドに関する研究(4) ワカメタンパク質プロテアーゼ分解物のアンジオテ ンシンI変換酵素阻害ペプチドの分離同定とそのジペ プチド誘導体について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 水産大学校 公開日: 2024-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 末綱, 邦男 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2011734

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



魚介類由来の生理活性ペプチドに関する研究—IV ワカメタンパク質プロテアーゼ分解物の アンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドの分離同定と そのジペプチド誘導体について

末綱邦男*

Studies on Biologically Active Peptide Derived from Fish and Shellfish-IV Separation and Identification of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from the Protease Hydrolyzate of *Undaria pinnatifida* Protein and their Dipeptide Derivatives

Kunio Suetsuna*

The hydrolysate fractions having the potent angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity were obtained from *Undaria pinnatifida* protein hydrolysate using Protease S and Proleather FG-1. The fractions were chromatographed on a Dowex 50W(H⁺) and reverse-phase HPLC to yield dipeptides with ACE inhibitory activity. These dipeptides were identified by amino acid and sequence analyses as Ile-Tyr (IC₅₀; 13.4 μM), Lys-Tyr (7.7 μM), Lys-Phe (28.3 μM) and Phe-Tyr (39.8 μM) derived from the Protease S hydrolysate, and Ile-Trp (12.4 μM), Val-Tyr (11.3 μM), Lys-Tyr (9.2 μM) and Val-Phe (43.7 μM) derived from the Proleather FG-1 hydrolysate. Using the Lys-Tyr analogues which were newly synthesized, the interaction between ACE inhibitory dipeptides and the active site of ACE was presumed.

1 緒言

レニン-アンジオテンシン系 (RA系) は高血圧の発症・維持に重要な役割を果たしている。特に、アンジオテンシンIIは生体内において最も強い昇圧作用を有し、この物質はアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の作用によりアンジオテンシン I から生成される。ACE活性を抑制し血圧を低下させることを目的として、1977年、Ondettiら¹⁾により、ACE阻害剤であるカプトプリルが開発された。一方、食品の高付加価値化を目的として食品中のACE阻害物質を検索する試みや、食品中のタンパク質成分を消化

することにより顕在化するACEペプチドに関する報告も数多くなされてきた。その中で、特定保健用食品としてカゼインのトリプシン分解物²⁾、カツオ節のサーモラシン分解物³⁾、カルピス酸乳⁴⁾、およびイワシ筋肉のアルカリプロテアーゼ分解物⁵⁾が、“血圧が高めのヒトに適した食品”の表示で厚生省認可を受けている。一方、海藻由来のACE阻害ペプチドについては、著者がヒジキ、ノリおよびワカメ由来タンパク質のペプシン消化物からACE阻害ペプチドを見出し、これらACE阻害ペプチドの高血圧自然発症ラット (SHR) への経口投与で有意に血圧を低下させることを確認し⁶⁻⁸⁾、ワカメ由来のACE阻害ペプチド

2001年6月29日受付。Received June. 29, 2001

*水産大学校 食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)

としては4種類のテトラペプチド (Ala-Ile-Tyr-Lys, Tyr-Lys-Tyr-Tyr, Lys-Phe-Tyr-Gly, Tyr-Asn-Lys-Leu) を報告してきた。しかし、これらACE阻害ペプチドが実際に体内で生体調節機能を発揮するためには消化管プロテアーゼに耐性があり、かつ吸収されやすい短鎖ペプチドを取得することが望まれる。そこで今回、基質としてワカメタンパク質を、酵素として各種市販プロテアーゼを用いて加水分解し、ペプチド結合数の割合を示すタンパク質の分解率 (%) を指標として、これら分解物から短鎖ACE阻害ペプチドを分離同定することを目的とした。さらにリシン含有ジペプチド誘導体を合成し、ACEとの相互作用からその構造活性相関を検討した。

2 実験方法

2.1 ワカメタンパク質の調製と一般成分分析

徳島県鳴門市大毛島地区において、1998年1月から6月にかけて採集した天然産ワカメを十分洗浄して供試料とした。採集されたワカメ葉状部2.4kgを細かく刻み、0.5M Tris-HCl緩衝液 (pH7.9) 24ℓ 加え攪拌 (37°C, 36h) 後、グラスフィルター (G-3) で吸引ろ過した。グラスフィルター上の残渣に脱イオン水を加えてホモジナイズ後、凍結乾燥してワカメ由来のタンパク質粉末を調製した。

水分量は常圧加熱乾燥法により加熱乾燥 (110°C, 6~7h) し定量した。タンパク質量はケルダール法によって窒素量を定量し、100/16を乗じて算出した。脂質量はFolch法によって抽出、定量した。灰分量は直接灰化法により加熱 (550~600°C) し、冷却後、定量した。糖質量はフェノール硫酸法により定量し全糖換算とした。繊維量はこれら水分、タンパク質、脂質、灰分および糖質を差し引いた値で算出した。

2.2 使用酵素

製薬会社4社からの合わせて17種類のプロテアーゼを供試した。すなわち、天野製薬製プロテアーゼとしてニューラーゼF (*Rhizopus niveus*, pH3.0), プロテアーゼM (*Asperigillus oryzae*, pH3.0), プロテアーゼA (*Asperigillus oryzae*, pH7.0), プロテアーゼN (*Bacillus subtilis*, pH7.0), プロテアーゼP (*Asperigillus melleus*, pH8.0), プロテアーゼS (*Bacillus sp.*, pH8.0), プロレザーFG-1 (*Bacillus sp.*, pH10.0), パンクレアチ

ンF (*Animal pancreas*, pH8.0), パパインW-40 (*Carica papaya*, pH8.0) およびプロメラインF (*Pineapple cannery*, pH8.0) の10種類を用いた。ナガセ生化学工業製プロテアーゼとしてデナチームAP (*Asperigillus oryzae*, pH7.5), ビオプララーゼSP-4 (*Bacillus subtilis*, pH8.0) およびデナプシン2P (*Asperigillus sp.*, pH3.0) を、科研製薬製としてプロナーゼE (*Streptomyces griseus*, pH8.0) を用いた。さらにBoehringer-Mannheim社製プロテアーゼとしてペプシン (*porcine stomach mucosa*, pH2.0), キモトリプシン (*bovine pancreas*, pH8.0) およびトリプシン (*bovine pancreas*, pH8.0) を用いた。

2.3 ワカメタンパク質のプロテアーゼ分解とペプチド成分の分離・精製

2.1で調製したワカメタンパク質粉末10gに脱イオン水250mlを加えた各タンパク質溶液に、17種類の市販酵素をそれぞれ0.3g添加した。基質・酵素混合液のpHを、0.1N HClまたは0.1N NaOHで各至適pHに調整した後、酵素分解 (37°C, 24h) した。各分解液を遠心分離 (2,500rpm, 15min) 後、遠心上清液を得、タンパク質の分解率測定に供した。

さらに酵素分解終了後、酵素失活のため各分解液を煮沸処理 (100°C, 15min) した。ろ紙 (東洋ろ紙No.2) を用いる過したろ液をDowex 50W(H⁺)カラム (4.5×43cm) に負荷し、脱イオン水2ℓで洗浄後、2N NH₄OH 2ℓにて吸着しているペプチド成分を溶出した。アンモニアを除去した後、凍結乾燥してペプチド粉末を得た。

タンパク質の分解率 (%) 測定はSwaisgoodら⁹⁾の方法に準じ、全ペプチド結合数に対する分解されたペプチド結合数の割合で示した。oPA発色試薬として、100mM 四ホウ酸ナトリウム溶液25ml, 20%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) 溶液2.5ml, 4.0%オルトフタルアルデヒド(oPA) /メタノール溶液1.0ml および2-メルカプトエタノール0.1mlを合わせ、蒸留水にて50mlとした溶液を使用した。上記酵素分解液の遠心上清液0.03mlにoPA発色試薬4.0mlを加え攪拌後、吸光度340nmを測定し、分解率 (%) = $(M \times \Delta A_{340} \times 100) / (d \times \epsilon \times [P])$ で求めた。ここで、Mはタンパク質の平均残基分子量、 ΔA_{340} は酵素分解前後のoPA法による吸光度の変化、dは希釈度、[P]はタンパク質濃度 (mg/ml) であり、 $\epsilon = 6,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。

2.4 ACE阻害活性の測定

ACE阻害活性測定として合成基質Hippuryl-His-Leu (ペプチド研究所製)を用い、ACEが基質の末端ジペプチドHis-Leuを選択的に切断して遊離した馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、その抽出液の228nmの吸光度を測定するCushmanら¹⁰⁾の方法を一部変更して行った。変更し先立って最適条件を決定するために基質濃度、反応時間を種々変更した予備実験を行い、それに基づいて以下の条件を設定した。すなわち、短試験管(14×105mm)に7mM基質溶液250 μ lと試料液50 μ lを入れ反応(37°C, 5min)させた。次にACE溶液100 μ l(5mUnitに相当)を添加して反応(37°C, 30min)させた。酵素溶液はACE(ウサギ肺由来, Sigma社製)10Unitを0.4M NaClを含む0.1M ホウ酸緩衝液(pH8.3)200mlに溶かして調製した。反応後、1N HClを100 μ l添加し放置(室温, 5min)後、酢酸エチル4mlを加えて攪拌し、ACEによって基質から遊離した馬尿酸を抽出した。遠心分離(2,000rpm, 5°C, 3min)して得た透明な上層の酢酸エチル2mlを短試験管に分取して、エバポレーターにて乾固させた。この乾固物に1M NaCl 1.0mlを加えて溶解し、馬尿酸の特異波長である228nmの吸光度を測定した。試料液での吸光度を E_s 、試料液の代わりに緩衝液を加えた時の値を E_c 、ACEを加える前に1N HClを予め加えて反応させた時の値を E_0 として、阻害率(%) = $\{(E_s - E_0) / (E_c - E_0)\} \times 100$ で求めた。試料液のACE阻害活性(IC_{50} 値)は、試料液の濃度を変化させて阻害活性を測定し、50%阻害率を示す反応液中の阻害物質濃度で示した。

2.5 プロテアーゼSおよびプロレザートFG-1由来ACE阻害ペプチドの精製

ワカメタンパク質のプロテアーゼ分解物中、分解率の高かったプロテアーゼSアミノおよびプロレザートFG-1由来のペプチド粉末について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるペプチドの分離・精製を行った。ペプチド粉末7mgを0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)25 μ lに溶解しHPLCに負荷した。カラムとしてDevelosil ODS-5(4.6×250mm, 野村化学社製)を用い、溶離液として0.05%TFAから、0.05%TFAを含む16.7%アセトニトリル(AcCN)溶液への濃度勾配法(流速; 1.0 ml/min, 検出波長; 220nm)で行った。このHPLCにより出現した100個前後のフラグメントピークを分取し凍結乾燥して

ACE阻害活性を測定後、活性の高いピークについて再度HPLCした。カラムとしてCG-320HQ(7.6×300mm, 昭和電工社製)を、溶離液には5%AcCNを含む50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.8)を用いて、流速1.0ml/min, 検出波長220nmでペプチドの分離を行った。

2.6 ACE阻害ペプチドのアミノ酸配列決定とジペプチド合成

HPLCで単離精製したACE阻害ペプチドフラグメントのアミノ酸分析は、常法により塩酸加水分解後、PICO-TAGTMアミノ酸分析計(Waters社製)を用いて行った。ACE阻害ペプチドのアミノ酸配列は、自動エドマン分解により477A型プロテインシーケンサー(Applied Biosystem社製)を用いて決定した。

原料アミノ酸、合成試薬はすべてApplied Biosystem社製を用い、ペプチド自動合成装置430A型(Applied Biosystem社製)を使用して固相法によってジペプチドを合成した。固相担体としてはスチレンジビニルベンゼン重合体(ポリスチレン樹脂)をクロロメチル化した樹脂を用いた。C末端アミノ酸がリシンであるジペプチドの場合、C末端側のリシンからクロロメチル樹脂に反応させてペプチド結合樹脂を得た。また、N末端アミノ酸がリシンであるジペプチドの場合、C末端側の各アミノ酸からクロロメチル樹脂に反応させてペプチド結合樹脂を得た。この場合、C末端アミノ酸はt-ブトキシカルボニル基(t-Boc基)で保護されたt-Bocアミノ酸を用いた。次に、このペプチド結合樹脂をエタンジチオールとチオアニソールからなる混合液に懸濁し、攪拌(室温, 30min)後、氷冷下でTFAを加え、さらに攪拌(10min)した。この混合液にトリフルオロメタンスルホン酸を滴下し、攪拌(室温, 30min)した後、無水エーテルを加えてその生成物を沈殿させて分離し、その沈殿物を無水エーテルで数回洗浄した後、減圧下で乾燥した。このようにして得られた未精製の合成ジペプチドは蒸留水またはメタノールに溶解した後、逆相カラムCAPCELL PAK C-18(10×250mm, 資生堂社製)を用いたHPLCにより精製した。溶離液として0.05%TFA含有AcCN溶液から、0.05%TFAを含む25%AcCN溶液への濃度勾配法によって、流速4.0ml/min, 波長220nmで検出した。最大吸収を示した溶出画分を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成リシン含有ジペプチドを得た。

Table 1. Degree of hydrolyzation, yield and ACE inhibitory activity

Enzyme	Degree of hydrolyzation (%) ¹⁾	Yield (%)	IC ₅₀ value (mg/ml) ²⁾
Newlase F	43.7	54.2	2.19
Protease M	48.4	49.5	1.37
Protease A	47.1	42.8	0.72
Protease N	48.8	38.7	0.72
Protease P	44.9	46.1	1.29
Protease S	53.6	57.7	0.38
Proleather FG-1	54.2	42.4	0.49
Pancreatin F	32.7	34.7	1.76
Papain W-40	26.8	38.1	1.68
Blomelan F	21.6	33.3	1.32
Denazyme AP	47.9	61.1	0.53
Biopraxe SP-4	38.6	53.6	0.85
Denapsin 2P	33.6	47.2	1.02
Pronase E	37.8	30.6	1.13
Pepsin	49.3	57.8	0.25
Chymotrypsin	44.1	42.0	0.71
Trypsin	36.7	33.9	0.93

¹⁾ Degree of hydrolyzation was expressed before the purification by Dowex 50W column chromatography.

²⁾ IC₅₀ value means the concentration of inhibitor which inhibits half activity of ACE.

Table 2. Analytical data and ACE inhibitory activity of the isolated dipeptides by HPLC

Retention time (min)	Dipeptide	Amino acid ratio ¹⁾	IC ₅₀ value (μM) ²⁾
34.5 ³⁾	Ile-Tyr	Ile 1.26, Tyr 0.97	13.4
38.7 ³⁾	Lys-Tyr	Lys 0.79, Tyr 1.08	7.7
56.2 ³⁾	Lys-Phe	Lys 0.85, Phe 1.12	28.3
59.9 ³⁾	Phe-Tyr	Phe 1.08, Tyr 1.16	39.8
27.7 ⁴⁾	Ile-Trp	Ile 1.33, Trp 0.94	12.4
41.8 ⁴⁾	Val-Tyr	Val 1.27, Tyr 1.14	11.3
48.4 ⁴⁾	Lys-Tyr	Lys 0.81, Tyr 1.03	9.2
62.7 ⁴⁾	Val-Phe	Val 1.25, Phe 1.07	43.7

All amino acids are of the L-configuration.

¹⁾ Each peptide was hydrolyzed with 6N HCl at 110°C for 24h.

²⁾ IC₅₀ value means the concentration of inhibitor which inhibits half activity of ACE.

³⁾ Expressed under the HPLC of the peptide powder hydrolyzated by Protease S.

⁴⁾ Expressed under the HPLC of the peptide powder hydrolyzated by Proleather FG-1.

3 結果および考察

3.1 ワカメタンパク質の調製

ワカメ乾燥物中には15~20%のタンパク質を含むといわれているが¹¹⁾, プロテアーゼ分解に先立ち、基質として出来るだけタンパク質含量の高いワカメを調製する必要がある。ここでは、渡辺・西澤ら¹²⁾ の報告に準じてワカメ藻

体中に内在するアルギン酸リアーゼによるワカメ組織の軟化崩壊方法を利用した。生ワカメ葉状部を破碎後、緩衝液中で反応 (37°C, 36h) して生成する多糖類、繊維質を含むペースト液を除去することによりワカメ由来のタンパク質粉末を得た。この粉末の一般分析の結果は、水分2.8g/100g, タンパク質74.1g/100g, 脂質2.1g/100g, 糖質10.4g/100g, 繊維9.1g/100g, 灰分1.5g/100gであった。また、生ワカメ2.4kgからワカメタンパク質粉末483g (みかけの

Table 3. ACE inhibitory activity of synthetic dipeptides containing lysine

NH ₂ -terminal Lys dipeptide	IC ₅₀ value (μM) ¹⁾	COOH-terminal Lys dipeptide	IC ₅₀ value (μM) ¹⁾
Lys-Tyr	13.2	Pro-Lys	46.3
Lys-Trp	19.3	Asp-Lys	60.2
Lys-Phe	28.3	Cys-Lys	81.6
Lys-Met	28.4	Gly-Lys	85.4
Lys-Pro	33.1	Ser-Lys	97.7
Lys-His	36.8	Val-Lys	165
Lys-Cys	45.0	Thr-Lys	196
Lys-Ile	45.9	Lys-Lys	213
Lys-Leu	50.2	Phe-Lys	315
Lys-Gly	71.4	Arg-Lys	343
Lys-Ala	106	Ile-Lys	430
Lys-Ser	107	Tyr-Lys	610
Lys-Lys	213	Trp-Lys	650
Lys-Val	445	His-Lys	703
Lys-Arg	548	Ala-Lys	755
Lys-Asp	864	Met-Lys	770
Lys-Thr	940	Asn-Lys	810
Lys-Asn	1037	Leu-Lys	907
Lys-Gln	1049	Gln-Lys	1043
Lys-Glu	1500	Glu-Lys	1500

¹⁾ IC₅₀ value means the concentration of inhibitor which inhibits half activity of ACE.

回収率20.1%)を得た。

3.2 酵素分解とペプチド成分のACE阻害活性

ワカメタンパク質粉末(タンパク質含量74.1%)を基質として、17種類の市販酵素で加水分解した。これら分解液の全ペプチド結合数に対する分解されたペプチド結合数の割合を求め、OPA法を用いてタンパク質の分解率を測定した。Table 1に示すように、プロテアーゼSとプロレザ-1による分解率は50%以上を示し、その他のプロテアーゼによるそれは50%以下であった。この結果、プロテアーゼSとプロレザ-1分解液には短鎖ペプチドすなわちジペプチドを多く含むことが推察されることから、これらプロテアーゼはエキソペプチダーゼ活性が強いといえる。さらに、これらプロテアーゼの起源が細菌(*Bacillus*属)由来であること、至適pHがアルカリ側であること等が短鎖ペプチド(ジペプチド)を生成し易い条件となっていると考えられた。

強酸性陽イオン交換樹脂(Dowex 50W)に吸着・脱着して得たペプチド粉末についてワカメタンパク質からの回

収率(%)を測定した。その結果、デナチームAP、ペプシン、プロテアーゼS、ニューラーゼFおよびバイオプレーゼSP-4分解液由来ペプチド粉末の回収率は50%を越えていた。次に各ペプチド粉末についてACE阻害活性を測定した結果、ペプシンによるペプチド粉末の阻害活性が最も強くIC₅₀値; 0.25mg/mlを示し、次いでプロテアーゼSとプロレザ-1によるペプチド粉末であり、各々0.38mg/mlと0.49mg/mlを示した。これらの結果、プロテアーゼSとプロレザ-1によるペプチド粉末は、他のプロテアーゼによるペプチド粉末に比べてジペプチドを多く含み、かつACE阻害活性が高いといえる。

3.3 プロテアーゼSおよびプロレザ-1分解物由来のACE阻害ジペプチド

分解率およびACE阻害活性がいずれも高かったプロテアーゼSおよびプロレザ-1分解物由来ペプチド粉末について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるACE阻害ペプチドの分離精製を行った。それぞれ100個前後のペプチドフラグメントが出現したが(データ省略)、

これらを分取、凍結乾燥してACE阻害活性測定後、活性の高いピークについて再度HPLCした。再HPLCにより分離する数個のペプチドフラグメントについて再度ACE阻害活性測定後、活性の高いピークについてアミノ酸分析とアミノ酸配列決定を行った (Table 2)。この結果、プロテアーゼS分解物由来ペプチド粉末からIle-Tyr, Lys-Tyr, Lys-Phe, Phe-Tyrを、また、プロレザートFG-1分解物由来ペプチド粉末からIle-Trp, Val-Tyr, Lys-Tyr, Val-Pheを分離・同定した。これらジペプチドの中で活性が最も高く、かつ2種類のプロテアーゼ分解物由来に共通しているACE阻害ジペプチドはLys-Tyr (IC_{50} 値; $7.7 \mu M$ および $9.2 \mu M$)であった。

チロシン含有のACE阻害ジペプチド誘導体についての検討はすでに多く報告¹³⁻¹⁶⁾されているので、本報告ではリシン含有ジペプチドを合成しそのACE阻害活性について検討を行った (Table 3)。この結果、ACE阻害活性はC末端にリシンを有するジペプチドの方がN末端にリシンを有するジペプチドに比べて高い傾向にあった。ACEとジペプチドの構造活性相関についてはCheungら¹³⁾により報告されているが、ジペプチドのアミノ基末端 (N末端) 側に疎水性アミノ酸 (Ile, Leu, Val), カルボキシル基末端 (C末端) 側に芳香族アミノ酸 (Tyr, Phe) あるいはプロリンであるジペプチドの活性が高いとされている。また、川上ら¹⁷⁾はC末端がトリプトファンやプロリンなどの疎水性アミノ酸も活性発現に大きく関与していると述べている。今回、リシン含有ジペプチド誘導体のACE阻害活性測定の結果はこれらの報告を裏付けるものであった。

先に、著者⁷⁾はACEの活性部位は正電荷をもつ部位、水素結合をする部位、亜鉛イオンを含む部位の3ヶ所が考えられると論じた。今回の実験結果からACE阻害リシン含有ジペプチドの場合、第1の正電荷をもつ部位にはC末端アミノ酸のカルボキシル基が包接部位として、また、第2の水素結合をする部位にはペプチド結合のカルボニル基が包接部位として働いており、これら第1、第2部位だけでACE阻害活性を発現すると考えられる。残り第3の活性部位、亜鉛イオンを含む部位にACE阻害ジペプチドがどのように関わっていくかは、N末端アミノ酸の種類を置き換えての詳細な検討が必要である。一方、ACEはアンジオテンシンIのC末端側のPhe-His-LeuからHis-Leuを切断する反応を触媒することから、その活性部位にはこれらアミノ酸残基との親和性を有する疎水部分が存在し、反対にACEを拮抗阻害するペプチドには一定の疎水性が必要であることから、高いACE阻害活性発現には疎水性ア

ミノ酸を含むことが必要と考えられる。このこともリシン含有ジペプチド誘導体のACE阻害活性測定の結果を裏付けるものであった。

今後、基質としてのタンパク質および酵素の選択、分解条件等の検討を行い、さらにACE阻害活性の高い短鎖ペプチドを創製していくことが望まれる。

文 献

- 1) M.A. Ondetti, B. Rubin, and D.W. Cushman: *Science*, **196**, 441-444 (1977).
- 2) 関屋宗一郎・小林義雄・喜多英一・今村吉水・戸山靖一: *栄食誌*, **45**, 513-517 (1992).
- 3) 藤田裕之・安本良一・長谷川昌康・大嶋一徳: *薬理と治療*, **25**, 2161-2165 (1997).
- 4) Y. Hata, M. Yamamoto, M. Ohni, K. Nakajima, and Y. Nakamura: *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 767-771 (1996).
- 5) 関栄治・川崎晃一・吉田真弓・箆島克裕・玉屋圭・松井利郎・箆島豊: *栄食誌*, **52**, 271-277 (1999).
- 6) 末綱邦男: *日水誌*, **64**, 862-866 (1998).
- 7) 末綱邦男: *水産大研報*, **46**, 183-189 (1998).
- 8) K. Suetsuna, and T. Nakano: *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 450-454 (2000).
- 9) F.C. Church, D.H. Porter, G.L. Catignani, and H.E. Swaisgood: *Anal. Biochem.*, **146**, 343-348 (1984).
- 10) D.W. Cushman, and H.S. Cheung: *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637-1648 (1971).
- 11) 四訂日本食品標準分析表, 9版, 第一出版, 東京, 1990, pp.181-182.
- 12) 渡辺忠美・西澤一俊: *日水誌*, **48**, 237-241 (1982).
- 13) H.S. Cheung, F.L. Wang, M.A. Ondetti, E.F. Sabo, and D.W. Cushman: *J. Biol. Chem.*, **255**, 401-407 (1980).
- 14) 関英治・箆島克裕・松藤寛・松井利郎・箆島豊: *農化誌*, **69**, 1013-1020 (1995).
- 15) K. Yokoyama, H. Chiba, and M. Yoshikawa: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1541-1545 (1992).
- 16) 斎藤喜幸・中村圭子・川戸章嗣・今安聰: *農化誌*, **66**, 1081-1087 (1992).
- 17) 川上晃・茅原紘: *栄食誌*, **46**, 425-428 (1993).