

## スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の 肝臓の Cathepsin B1 の精製

稲葉 喬・山田 和久\*・竹井 宏\*\*

(生物化学教室)

昭和 53 年 5 月 31 日 受理

Purification of Cathepsin B1 from the Liver of Squid,  
*Ommatostrephes sloani pacificus*

Takashi INABA, Kazuhisa YAMADA and Hiroshi TAKEI

(Laboratory of Biological Chemistry)

Received May 31, 1978

### Summary

Cathepsin B1 [EC 3. 4. 22. 1] from the liver of squid, *Ommatostrephes sloani pacificus*, was purified by the following steps: homogenization, ammonium sulfate fractionation (30–90% saturation), DE-23 cellulose column chromatography at pH 5.0, CM-23 cellulose column chromatography at pH 5.0, gel filtration on Sephadex G-100, DE-23 cellulose column chromatography at pH 6.8, isoelectrofocusing (pH 3.5–10) and DE-23 cellulose column rechromatography at pH 6.8. The purified cathepsin B1 gave a single band on polyacrylamide gel electrophoresis both at pH 4.3 and pH 9.5, and had an isoelectric point of about 5.7. The molecular weight of the enzyme was determined to be about 18,000 by gel filtration on Sephadex G-75, and was also estimated to be about 20,900 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH for the hydrolysis of  $\alpha$ -N-benzoyl-L-argininamide (BAA) and  $\alpha$ -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA) was about 5.0. The value of  $K_m$  for the hydrolysis of BANA was estimated to be 2.17 mM at 40°C in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0.

### 緒 言

cathepsin B (EC 3. 4. 22. 1) に関する多くの研究<sup>1-9)</sup> によって,  $\alpha$ -N-benzoyl-L-argininamide (BAA),  $\alpha$ -N-benzoyl-L-arginine-2-naphthylamide (BANA) と  $\alpha$ -N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPA) の加水分解を触媒する cathepsin B1 と BAA の加水分解のみを触媒する cathepsin B2 が動物組織中に存在することが明らかにされてきた。

cathepsin B1 は, これまでに, 牛の肝臓<sup>2)</sup>・ヒ臓<sup>3)</sup>, ネズミの肝臓<sup>4)</sup>, 人の肝臓<sup>5)</sup>, ウサギの肝臓<sup>6)</sup> およびイカ類の肝臓<sup>8-9)</sup> から部分的に或いは高度に精製されてきた。

前報<sup>8)</sup> において, スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓からポリアクリルアミド電気泳動的に均一な状態にまで精製された cathepsin B は哺乳動物の各種の組織から調製され

\* 現在 カルピス食品(株)中央研究所

\*\* 現在 マルホ製菓(株)研究所

た cathepsin B1 の分子量 (約25,000) よりも小さな分子量を有するであろうと推察された。別種のイカであるヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓から単離された cathepsin B1 は約13,600 の分子量を有することが明らかにされた<sup>9)</sup>。

スルメイカ, *O. sloani pacificus*, の肝臓の cathepsin B の本態を究明することは酵素化学的観点からも意義があると考えられた。その cathepsin B は, 前報<sup>8)</sup> においては基質として BAA のみを用いたために, cathepsin B1 か B2 か不明であったし, またその分子量も不明であった。本報告において, 前報<sup>8)</sup> に記載された方法を改良しながら, cathepsin B1 の精製を行うとともに, 単離された cathepsin B1 の2.3の酵素化学的性質について調べた結果を記載する。

## 実験方法

**材料** スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓は鮮魚店 (佐賀市) から提供され, 使用するまでディープフリーザー中に保存された。

$\alpha$ -N-benzoyl-L-argininamide · HCl (BAA) と  $\alpha$ -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide · HCl (BANA) はタンパク質研究奨励会 (大阪) から購入された。bovine serum albumin (結晶) は Sigma Chemical 社から得られた。CM-23 と DE-23 cellulose は Whatman 社の製品であった。Sephadex G-25, G-75 と G-100 は Pharmacia Japan 社から購入された。Ampholine (pH 3.5-10) は LKB 社から得られた。限外ろ過膜 (UM-2) と加圧セル (UF-202 と UF-12) は Amicon Far East 社から得られた。

**BAA 加水分解活性の定量** 2-mercaptoethylamine の存在下で cathepsin B1 および B2 によって触媒される BAA 加水分解反応において生成するアンモニアを, Weatherburn の方法<sup>10)</sup> に従って発色させた後, 625 nm における吸光度の増加を測定することによって定量した。反応混合液は, 100 $\mu$ l の酵素液, 40 mM 2-mercaptoethylamine, 1.0 mM EDTA · 2Na, 25 mM BAA および 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.5, から成り, その全容量は 400 $\mu$ l であった。アンモニアの標準曲線は, 標準物質として ammonium chloride を用いて最小二乗法によって作成された。

**BANA 加水分解活性の定量** L-cysteine の存在下で 30°C において cathepsin B1 によって触媒される BANA 加水分解反応において生ずる 2-naphthylamine を, Barrett の方法<sup>5)</sup> によって発色させた後, 520 nm における吸光度の増加を測定することによって定量した。反応混合液は, 500 $\mu$ l の酵素液, 1.46 mM L-cysteine, 0.73 mM EDTA · 2Na, および 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.5, から成り, その全容量は 2.05 ml であった。標準曲線は, 2-naphthylamine を標準物質として用いて最小二乗法によって作成された。

**タンパク質濃度の定量** タンパク質の濃度は, 280 nm における吸光度を測定することによって, 或いは Hartree<sup>12)</sup> によって改良された Lowry らの方法<sup>11)</sup> に従って, bovine serum albumin を標準物質として用いて測定することによって定量された。

**限外ろ過** 酵素液の濃縮は, UM-2 限外ろ過膜と加圧セル (UF-202 或いは UF-12) を用いて, 3.5-4.0 kg/cm<sup>2</sup> の窒素ガスで加圧しながら行われた。

**ポリアクリルアミドゲル電気泳動** ポリアクリルアミドゲル電気泳動は, 15%ゲルを用いて pH 4.3 と pH 9.5 において, Davis の方法<sup>13)</sup> に従って行われた。室温でゲルカラム 1 本当たり 4 mA の定電流を通電することによって, ゲルに添加されたタンパク質を泳動させた。泳動後, ゲル中のタンパク質は, Diezelらの方法<sup>14)</sup> に従って 0.25% coomassie brilliant blue G-250 を用いて染色された。

**焦点電気泳動** 酵素タンパク質の焦点電気泳動は, pH 3.5-10 の pH 勾配を与える ampholine を

用いて行われた。Vesterberg の方法<sup>15)</sup> に従って、あらかじめ 1.0% glycine に平衡化された酵素液を、0-40% sucrose (直線的濃度勾配) と 1.0% ampholine を含む LKB 焦点電気泳動カラム (110 ml) 中で、400V で 68 時間通電することによって泳動させた。泳動後、カラム内で分別されたタンパク質を 2.5 ml ずつ分取した。得られた各フラクションについて、タンパク質濃度、酵素活性および pH の測定を行った。

**Cathepsin B1 の精製** 下記の精製におけるすべての段階は 5°C で行われた。

**第 1 段階 抽出** スルメイカ, *O. sloani pacificus*, の肝臓 (約 6 kg) を 0.9% NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, を用いてワーリングブレンダー中でホモジナイズした。そのホモジネートをガーゼを用いてろ過した後、そのろ液を 8,000×g で 20 分間遠心分離した。その上清を, celite 535 と standard super-cel をろ過補助剤として用いて吸引ろ過した。その透明で褐色のろ液を粗酵素液と呼んだ。

**第 2 段階 硫酸分別** 粗酵素液に固体硫酸を機械的に攪拌しながら加えて 30% 硫酸飽和とした。その混合液を 2 時間静置した後、生じた沈殿を 8,000×g で 20 分間遠心分離することによって除去した。その上清にさらに硫酸を加えて 90% 飽和とした。その混合液を 2 時間静置した後、8,000×g で 20 分間遠心分離した。得られた沈殿を必要最少量の 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, に溶解した。この溶液をあらかじめ 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, で平衡化しておいた Sephadex G-25 カラム (9.0×43 cm) を用いてゲルろ過することによって、酵素液からの脱塩とその平衡化を行った。

**第 3 段階 DE-23 cellulose カラムクロマトグラフィー** 第 2 段階の酵素液を、0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, で平衡化しておいた DE-23 cellulose カラム (4.7×40 cm) に添加した。最初に、上記と同じ緩衝液を流して、カラムに吸着されないタンパク質を溶出させた。吸着されたタンパク質の溶出は、緩衝液中の NaCl の濃度を 0.3 M と 1.0 M と段階的に上げて行われた。Fig. 1 は

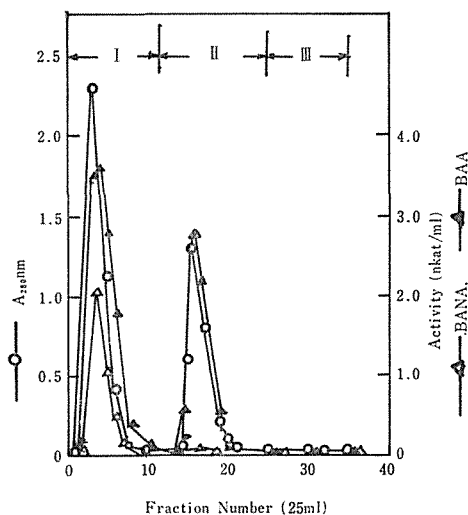


Fig. 1 DE-23 cellulose column chromatography. (4.7×40 cm)

- I. 0.01 M acetate buffer, pH 5.0
- II. The buffer containing 0.3 M NaCl
- III. The buffer containing 1.0 M NaCl

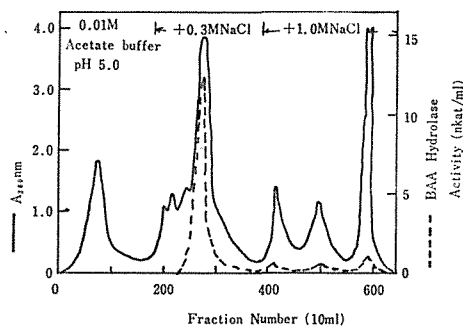


Fig. 2 CM-23 cellulose column chromatography. (4.7×43 cm)

そのクロマトグラムである。cathepsin B1はこのカラムを素通りして溶出したが、cathepsin B2はカラムに吸着され、0.3 M NaClを含む0.01 M 酢酸緩衝液、pH 5.0, で溶出してきた。

**第4段階 CM-23 cellulose カラムクロマトグラフィー** 前段階で得られた BANA 加水分解活性を有するフラクションを集めて、あらかじめ0.01 M 酢酸緩衝液、pH 5.0, で平衡化しておいた CM-23 cellulose カラム (4.7×43 cm) に直接添加した。カラムに吸着されたタンパク質は、0.3 M と 1.0 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 5.0, を用いて段階的に溶出させた。Fig. 2 はその溶出パターンである。cathepsin B1 の BAA 加水分解活性は、0.3 M NaCl を含む緩衝液で溶出されてきたフラクションに検出された。それらのフラクションを集めて、限外ろ過によって濃縮した。

**第5段階 Sephadex G-100 によるゲルろ過** 前段階で得られた酵素液を、あらかじめ 0.2 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 5.0, で平衡化しておいた Sephadex G-100 カラム (5×130 cm) に添加し、同じ緩衝液を用いて上昇法によって溶出した。その溶出パターンを Fig. 3 に示す。BAA 加水分解活性を有するフラクション (番号 66-100) を集めて、限外ろ過によって濃縮した。

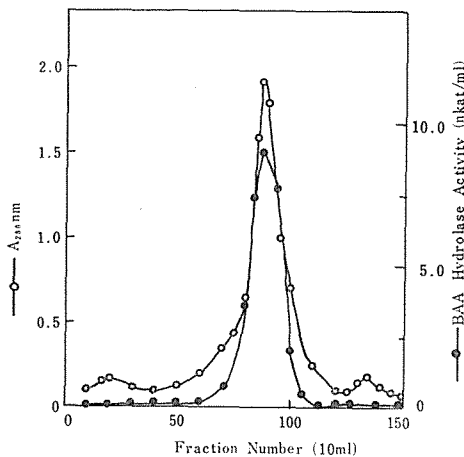


Fig. 3 Gel filtration on Sephadex G-100. (5×130 cm)

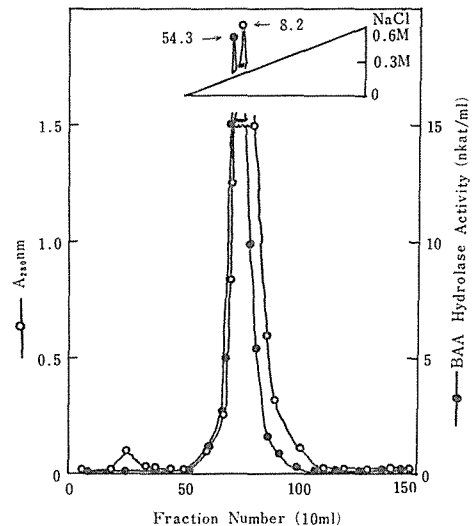


Fig. 4 DE-23 cellulose column chromatography. (3.6×30 cm)

**第6段階 DE-23 cellulose カラムクロマトグラフィー** 前段階で得られた酵素液を 0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.8, に平衡化した後、同じ緩衝液に平衡化しておいた DE-23 cellulose カラム (3.6×30 cm) に添加した。カラムを上記の緩衝液で十分洗い、溶出液の  $A_{280nm}$  が 0.1 以下になってから、カラムに吸着されたタンパク質を、緩衝液の NaCl 濃度を 0-0.6 M まで直線的に上げて溶出させた。Fig. 4 はそのクロマトグラムである。BAA 加水分解活性を有するフラクション (番号 85-105) を集めて、限外ろ過によって濃縮した。

**第7段階 焦点電気泳動** 前段階で得られた酵素液を限外ろ過によって 1.0% glycine に平衡化した。前記の操作にもとずいて、その酵素液を焦点電気泳動させた後、カラム中の pH 勾配によって分別されたタンパク質を 2.5 ml づつ分取した。Fig. 5 にその結果を示す。BAA 加水分解活性を有するフラクション (番号 16-24) を集めて、あらかじめ 0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.8, に平衡化しておいた Sephadex G-25 カラムを用いてゲルろ過した。

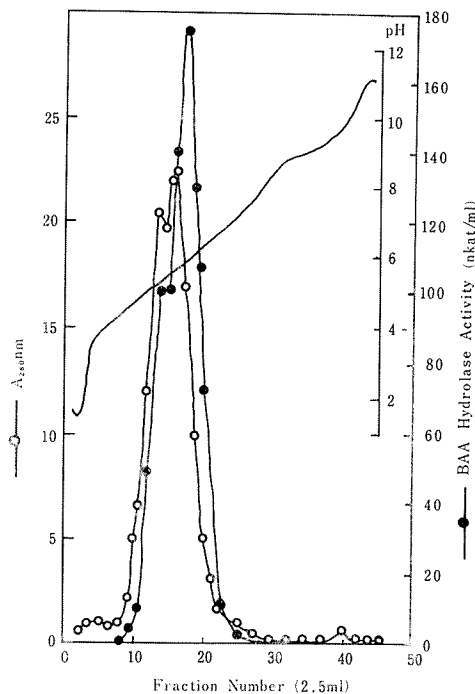


Fig. 5 Isoelectrofocusing (pH 3.5-10).

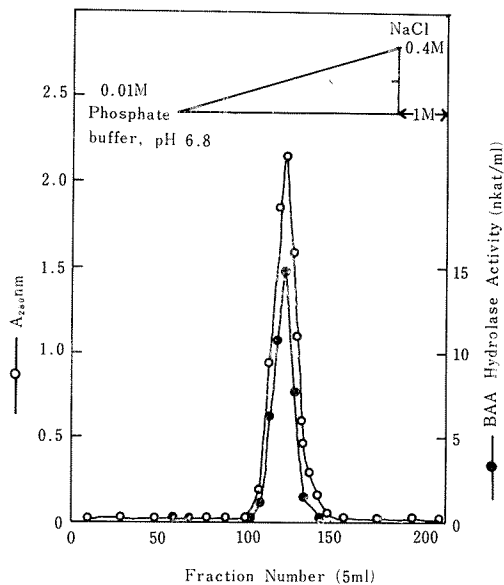


Fig. 6 DE-23 cellulose column rechromatography. (1.7×6 cm)

第8段階 DE-23 cellulose カラム再クロマトグラフィー 前段階で平衡化された酵素液を、0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.8、に平衡化しておいた DE-23 cellulose カラム (1.7×6 cm) に添加した。カラムを同じ緩衝液で洗った後、緩衝液中の NaCl 濃度を 0-0.4 M まで直線的に上げながら、吸着されたタンパク質の溶出を行った。Fig. 6 はそのクロマトグラムである。BAA 加水分解活性を有するフラクション (番号 134-136) を集めて、限外ろ過法によって濃縮した。

## 結 果

Cathepsin B1 の精製 第3段階において、粗酵素液を pH 5.0 で DE-23 cellulose を用いてクロマトした時、Fig. 1 に見られるように、BAA および BANA を加水分解する cathepsin B1 はカラムを素通りしたが、BAA のみを加水分解する cathepsin B2 はカラムに吸着され、0.3 M NaCl を含む 0.01 M 酢酸緩衝液、pH 5.0、によって溶出された。この溶出液に含まれる cathepsin B1 は、CM-23 cellulose カラムクロマトグラフィーによって濃縮された。Fig. 3 に見られるように、Cathepsin B1 は、Sephadex G-100 カラムによるろ過において、カラムの void volume の約 2 倍の位置に溶出された。この溶出液を pH 6.8 で DE-23 cellulose を用いてクロマトした時、Fig. 4 に見られるように、cathepsin B1 は DE-23 cellulose に吸着され、0.01 M リン酸緩衝液、pH 6.8、中の NaCl 濃度が約 0.2 M で溶出されたが、BAA 加水分解活性のピークとタンパク質のそれと一致しなかった。その酵素液を焦点電気泳動法によってさらに分別した時、Fig. 5 に見られるように、2つのタンパク質のピークが得られたが、BAA 加水分解活性のピークは、より高い pI 値をもつタンパク質のピークと一致した。その活性フラクションの純度をポリアクリルア

ミドゲル電気泳動によって調べた結果、強く染色された一本のタンパク質のバンドの他に弱く染色された一本のバンドが観察された。その活性フラクションを DE-23 cellulose カラムクロマトグラフィーによって再び分別した結果、Fig. 6 に見られるように、一つのタンパク質のピークが BAA 加水分解活性のピークと一致した。なお、精製過程における酵素活性の収量は Table 1 にまとめられている。この精製において酵素活性の収量は 5.0% であった。最終的に精製された cathepsin B1 標品は、Fig. 7 に見られるように、pH 4.3 と pH 9.5 とにおけるポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のタンパク質バンドを与えた。

Table 1. Purification of squid cathepsin B1.

Fraction	Total Activity (nkat)	Specific Activity nkat/mg
Extract	17,292	0.44
Ammonium sulfate	12,283	1.31
DE-23 cellulose	8,604	2.79
(stepwise)		
CM-23 cellulose (stepwise)	6,167	3.59
Sephadex G-100	3,404	5.06
DE-23 cellulose (gradient)	2,331	7.77
Isoelectrofocusing	1,147	12.4
DE-23 cellulose (gradient)	870	13.2

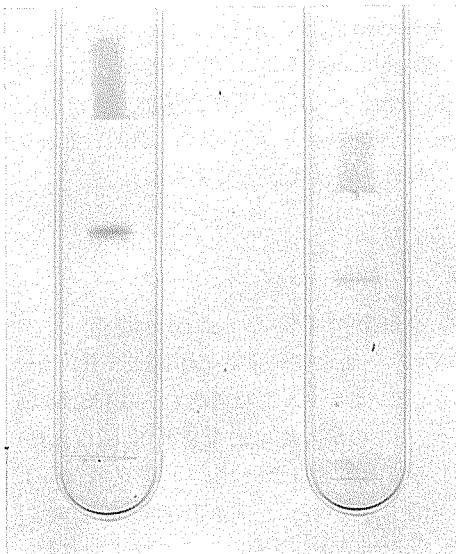


Fig. 7 Polyacrylamide gel electrophoresis of purified cathepsin B1.

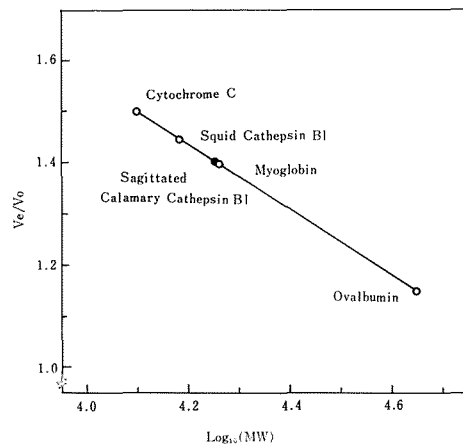


Fig. 8 Determination of molecular weight of cathepsin B1 on Sephadex G-75.

The protein solutions were applied to a Sephadex G-75 column (1×103.5 cm) equilibrated with 0.1 M acetate buffer containing 0.4 M NaCl, pH 5.0, and eluted with the same buffer.

**Cathepsin B1 の諸性質** Fig. 8 は、精製された cathepsin B1 の分子量を Sephadex G-75 カラム (1×103.5 cm) を用いて調べた結果を示している。スルメイカ, *O. sloani pacificus*, の肝臓から得られた cathepsin B1 の分子量は約 18,000 であると推定された。また、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって cathepsin B1 の分子量を調べた結果を、Fig. 9 に示す。標準タンパク質および cathepsin B1 の易動数 (Mobility) とそれらのタンパク質の分子量の常用対数との

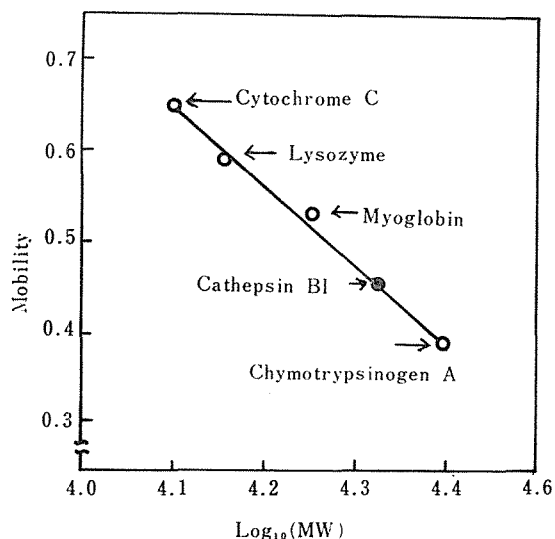


Fig. 9 Determination of molecular weight of cathepsin B1 on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

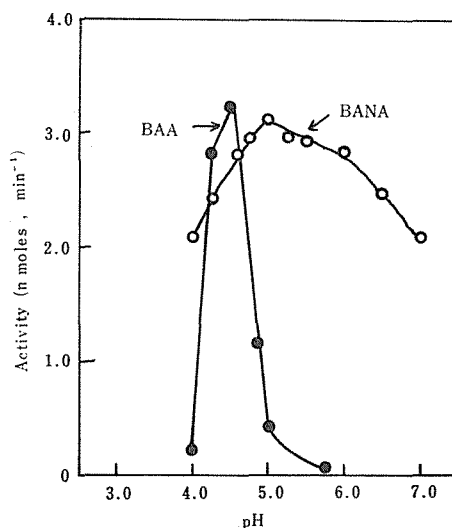


Fig. 10 pH-activity curves of cathepsin B1 against BAA and BANA.

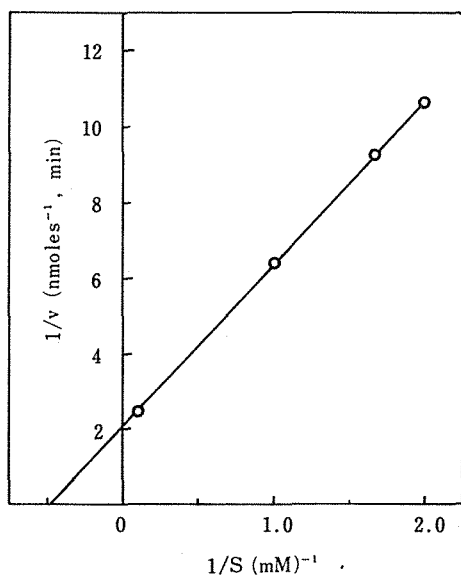


Fig. 11 Lineweaver-Burk plot of BANA concentration against activity of cathepsin B1.

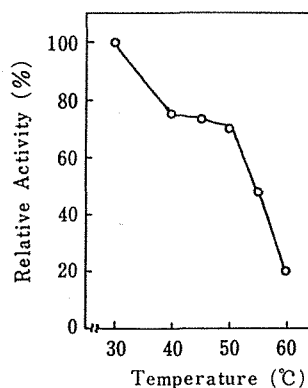


Fig. 12 Thermal stability of cathepsin B1. The enzyme solution was preincubated for 60 min at a given temperature at pH 5.0, and the remaining activity was measured.

間の関係から, cathepsin B1 の分子量は約 20,900 であると推定された。

cathepsin B1 の等電点は, 調製用焦点電気泳動の結果から, 約 5.7 であると推定された。

Fig. 10 に見られるように, 精製された cathepsin B1 は pH 4.5 附近の非常に限られた範囲で BAA の加水分解を触媒したが, BANA の加水分解に対しては pH 4-6.5 の範囲で活性を示した。BANA の加水分解に対する最適 pH は 5.0 であった。

Fig. 11 に示されるように, cathepsin B1 の BANA 濃度依存性を Lineweaver-Burk のプロットに従って作図して調べた結果から, 40°C で 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, という条件下では, cathepsin B1 の BANA に対する  $K_m$  値は 2.17 mM であると算出された。

Fig. 12 に見られるように, 精製された cathepsin B1 は pH 5.0 で各温度で 60 分間静置させた時, cathepsin B1 は 30-50°C の範囲で安定であったが, 50°C 以上の温度でその活性を失なった。また, cathepsin B1 による BANA 加水分解に及ぼす温度の影響について調べた結果から, その最適温度は 40-55°C であった。また, 精製された cathepsin B1 は, チオール化合物の非存在下で, -20°C において数カ月安定であった。

## 考 察

前報<sup>8)</sup>に記載されたように, スルメイカ, *O. sloani pacificus*, の肝臓の cathepsin B は哺乳動物の組織から得られた cathepsin B1 (M. W. 約 25,000) よりも小さく, その分子量は馬の myoglobin (M. W. 17,800) に近い値であろうと推察された。

この推察にもとずいて, 酵素液の脱塩・平衡には, 透析の代りに Sephadex G-25 によるゲルろ過と限外ろ過膜, UM-2 (分子量 1,000 以上の分子を保持する), を用いる限外ろ過法を採用した。

粗酵素液を DE-23 cellulose カラムを用いて pH 5.0 において分別した結果から, スルメイカの肝臓の抽出液には BAA と BANA の加水分解を触媒する cathepsin B1 と BAA のみを加水分解する cathepsin B2 が含まれていて, それらは互に分離されることが明らかになった。

最終的に単離されたスルメイカの cathepsin B1 の分子量は Sephadex G-75 によるゲルろ過によって約 18,000 であると推定された。しかしながら, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってその分子量を調べた結果, それは約 20,900 であると算出された。この SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質の分子量を求める時, 小さなタンパク質およびポリペプチド (M. W. 15,000 以下) は異常な泳動をするので, それらの分子量を決定する際, その誤差が大きくなると報告されている<sup>16)</sup>。スルメイカの肝臓から単離された cathepsin B1 は, すでにヤリイカ, *Dorytheuthis bleekeri*, の肝臓から単離されている cathepsin B1 (M. W. 約 13,600) よりもやや大きかった。

哺乳動物の組織の cathepsin B1 の BAA および BANA 加水分解に対する最適 pH は 6.0-6.2 であったが, スルメイカの cathepsin B1 のそれは約 5.0 であり, ヤリイカの cathepsin B1 の最適 pH 4.5<sup>9)</sup> に近い値であった。

スルメイカの cathepsin B1 の等電点は, ヤリイカの cathepsin B1 の等電点 (pI 6.8)<sup>9)</sup> よりも低く, 5.7 であった。

スルメイカの cathepsin B1 の BANA 加水分解における  $K_m$  値は 2.17 mM であり, ヤリイカの cathepsin B1 の  $K_m$  値 (1.4 mM)<sup>9)</sup> に近い値を示した。これらの  $K_m$  値は, 牛の肝臓から得られた cathepsin B1 について報告された  $K_m$  値である 20 mM<sup>2)</sup> よりもかなり小さな値であった。

これらの事実から, スルメイカの cathepsin B1 の特質は, ヤリイカの cathepsin B1 のそれと



類似していたが、哺乳動物の組織の cathepsin B1 のそれとかなり異っていることが明確になった。なお、スルメイカの cathepsin B1 はヤリイカの cathepsin B1 と同様に、今後 cathepsin B1 の本質について研究するための試料として、哺乳動物の組織の cathepsin B1 よりもすぐれていると思われる。

### 摘 要

スルメイカ, *Ommatostrephes sloani pacificus*, の肝臓から cathepsin B1 を下記の操作：ホモジナイズ, 硫酸分別 (30-90%飽和), DE-23 cellulose カラムクロマトグラフィー (pH 5.0), CM-23 cellulose カラムクロマトグラフィー (pH 5.0), Sephadex G-100 によるゲルろ過, DE-23 cellulose カラムクロマトグラフィー (pH 6.8), 焦点電気泳動 (pH 3.5-10) および DE-23 cellulose カラム再クロマトグラフィー (pH 6.8) によって精製した。精製された cathepsin B1 は, pH 4.3 と pH 9.5 におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のバンドを与えた。また、その酵素は pH 5.7 にその等電点を有した。その酵素の分子量は, Sephadex G-75 によるゲルろ過によって約 18,000 であると推定され、また SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって約 20,900 であると算出された。 $\alpha$ -N-benzoyl-L-argininamide (BAA) と  $\alpha$ -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA) の加水分解に対する最適 pH は約 pH 5.0 であった。BANA 加水分解に対する Km 値は、0.1 M 酢酸緩衝液, pH 5.0, で 40°C においては 2.17 mM であると算出された。

### 文 献

- 1) Greenbaum, L. M. and J. S. Fruton (1957). *J. Biol. Chem.*, **226**, 173.
- 2) Snellman, O. (1969). *Biochem. J.*, **114**, 673.
- 3) Otto, K. (1967). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **348**, 1449.
- 4) de Lumen, B. O. and A. L. Tappel (1972). *J. Biol. Chem.*, **247**, 3552.
- 5) Barrett, A. J. (1973). *Biochem. J.*, **131**, 809.
- 6) Ogino, K. and K. Nakanishi (1974). *J. Biochem.*, **75**, 723.
- 7) Otto, K. (1971). *Tissue Proteinase*, ed. by A. J. Barrett and J. T. Dingle, North-Holland Publishing, Amsterdam, pp. 1.
- 8) 稲葉 喬, 原 松次, 末永邦雄, 藤井 実 (1975). 佐賀大農彙, **38**, 31.
- 9) Inaba, T., N. Shindo and M. Fujii (1936). *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1159.
- 10) Weatherburn, M. W. (1967). *Anal. Chem.*, **39**, 71.
- 11) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. D. Randall (1951). *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- 12) Hartree, E. F. (1972). *Anal. Biochem.*, **48**, 422.
- 13) Davis, B. J. (1964). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404.
- 14) Diezel, W. G., Kopperschlager and E. Hofman (1972). *Anal. Biochem.*, **48**, 617.
- 15) Vesterberg, O. (1971). *Methods in Enzymol.*, Vol. XXII, ed. by W. B. Jakoby, Academic Press, New York, N. Y., pp. 389.
- 16) Weber, K. and M. Osborn (1975) *The Proteins*, 3rd edition, Vol. I, ed. by H. Neurath and R. L. Hill, Academic press, New York, N. Y., pp. 189.