

蛋白分解酵素

アクチナーゼ®

ACTINASE

(プロナーゼ、PRONASE)



KAKEN

科研製薬株式会社

目 次

I. アクチナーゼ製品	1
II. アクチナーゼの性質	1
1. 性 状	1
2. 安定性	1
(1) Ca イオンの保護効果	1
(2) 水溶液中での安定性	2
(3) pH に対する安定性	2
(4) 温度に対する安定性	3
3. 至適 pH	4
4. 至適温度	4
5. 基質特異性	5
6. タンパク質加水分解度	6
7. 酵素活性阻害因子	6
8. 酵素力価の測定方法	6
(1) 原 理	6
(2) 定 義	6
(3) 測定操作	7
(4) 力価表示法	7
(5) 試 液	8
9. アクチナーゼの貯法	8
10. アクチナーゼの脱 Ca 法	8
11. アクチナーゼの無菌化法	8
III. アクチナーゼの用途(試薬)	9
1. タンパク質の構造研究	9
2. 赤血球の構造、機能研究	9
3. 各種糖タンパク質からの糖ペプチドの分画の精製、分離	9
4. 生体組織中の非タンパク質の抽出	9
5. 細胞培養	9
6. 抗原の分離、解析	9
7. 高タンパク質食品中のビタミン B ₁ 、B ₂ 、油性天然色素の定量	10
8. ウイルスからの核酸の分離	10
9. 百日咳菌の感染防御抗原の抽出、精製	10
10. 細菌細胞壁の溶解	10

11. 薬剤の吸収促進および透過性亢進	10
12. 特異免疫反応の増強	10
13. その他	10
IV. アクチナーゼの用途(食品加工用・工業用)	11
1. 混合アミノ酸の製造	11
2. フィッシュ・ソリューブル、魚醤油の製造	11
3. 食肉の液化および軟化	11
4. パン製造	11
5. クラッカー、ビスケット製造	12
6. 味噌、醤油製造	12
7. 皮革の良質化	12
8. コラーゲン、ゼラチンの良質化	12
文 献	13

I. アクチナーゼ製品

アクチナーゼは、放線菌 *Streptomyces griseus* の培養ろ液から得られるタンパク質分解酵素プロナーゼの製品で、用途に応じて各力価の製品があります(表1)。

アクチナーゼのタンパク質分解作用は、極めて強力かつ広範で、基質タンパク質の有するペプチド結合をほとんど無差別に分解し、その分解度は 75～90%に達します。また、酸分解と比較して、生成したトリプトファンやメチオニン等が分解されないこと、反応条件が温和なこと、反応操作が容易なこと等の特徴があります。

アクチナーゼの応用分野としては、学術基礎研究をはじめとして食品加工、各種工業など多方面で広く使用されています。

表1 アクチナーゼ製品

製品名	力価(チロジン単位/g)	用途	包装単位
アクチナーゼ E	1,000,000	試薬用	1g、5g、100g、500g
アクチナーゼ AS	250,000	食品加工用	100g、500g
アクチナーゼ AF	250,000	工業用	100g、500g

II. アクチナーゼの性質

1. 性 状

アクチナーゼ E、アクチナーゼ AS: 淡褐色の粉末

アクチナーゼ AF: 淡褐色の粉末(試験が設定されていない)

わずかに特異な臭いのある粉末で、水に溶けやすく、アセトン、メタノールにほとんど溶けません。

2. 安定性

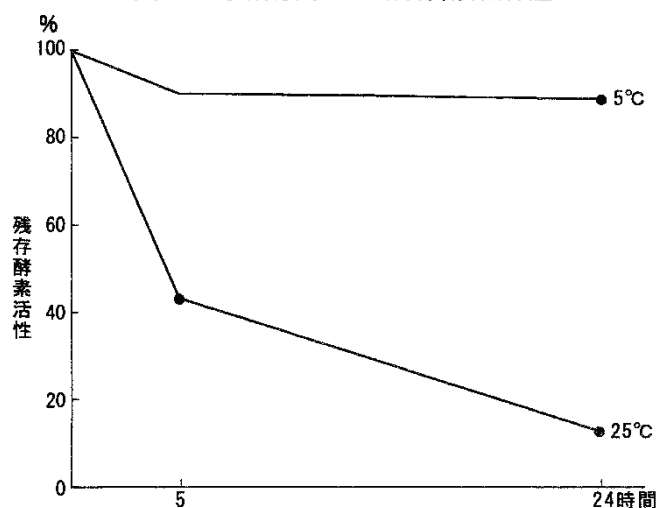
(1) Ca イオンの保護効果¹⁾

Ca イオンはアクチナーゼの活性保持に重要な役割を果たしています。製品中には安定化に必要な Ca イオンが含まれていますが、EDTA 処理、透析、硫酸塩析、イオン交換樹脂処理等により Ca イオンが欠如した場合には速やかに失活します。

(2) 水溶液中での安定性²⁾

アクチナーゼを蒸留水に溶解後、5℃もしくは 25℃で保存した場合の残存酵素活性をみると図 1 に示すように、5℃であれば 24 時間後でもかなりの活性が保持されますが、25℃では速やかな活性低下がみられます。

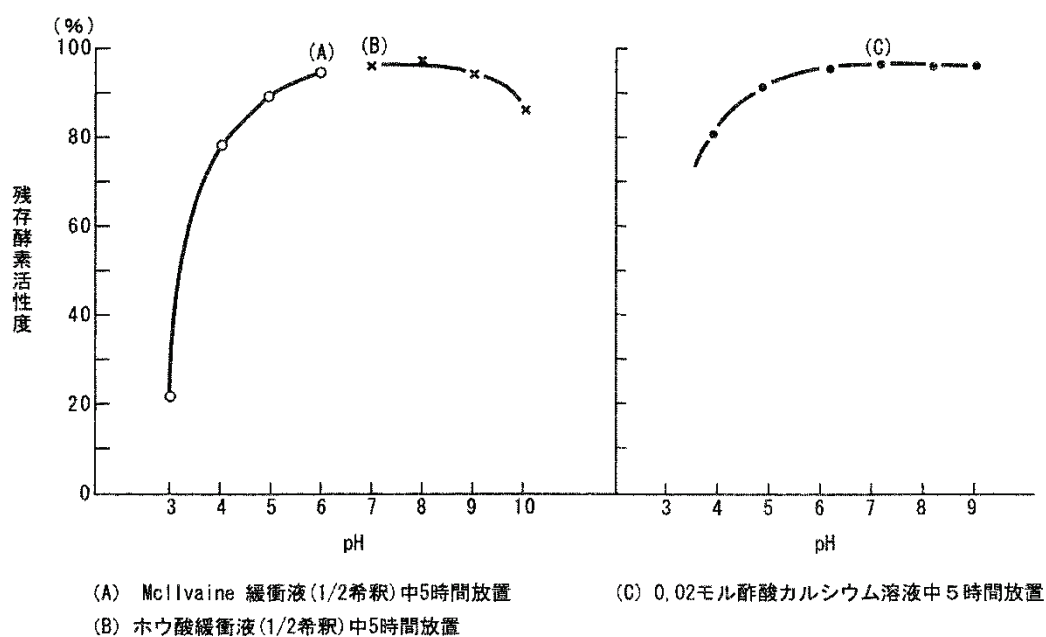
図 1 水溶液中での残存酵素活性



(3) pH に対する安定性³⁾

アクチナーゼを種々の pH の溶液に溶解し、室温に5時間放置した後、溶液中の残存酵素活性を測定すると、アクチナーゼは pH6~9では安定ですが、pH4以下および pH10 以上では不安定になります(図2)。

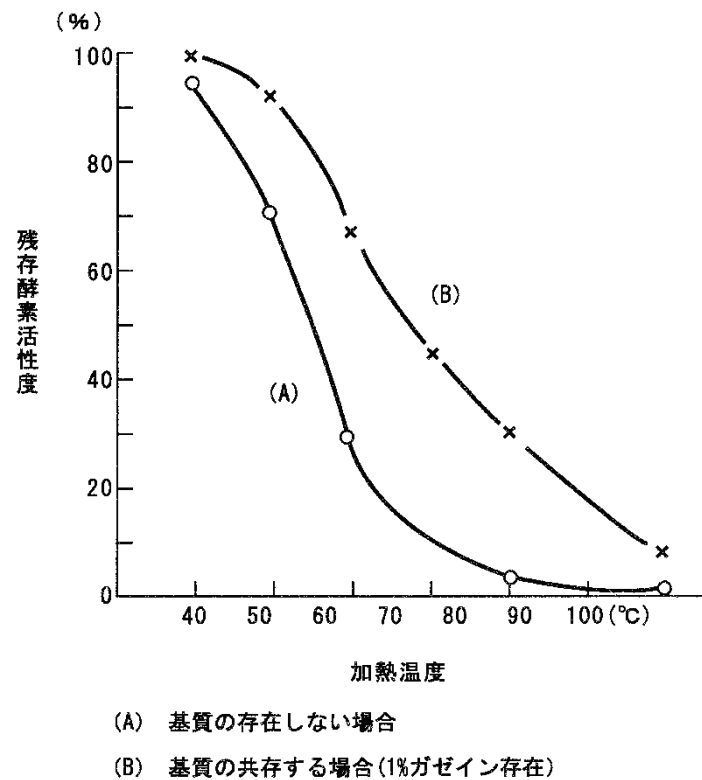
図 2 pHに対する安定性



(4) 温度に対する安定性³⁾

アクチナーゼを蒸留水に溶解し、40～100℃の各温度に10分間放置した後、残存酵素力価を測定すると、アクチナーゼは温度の上昇により残存酵素活性が低下しますが、基質が存在する場合には、熱に対する安定性が増加します(図3)。

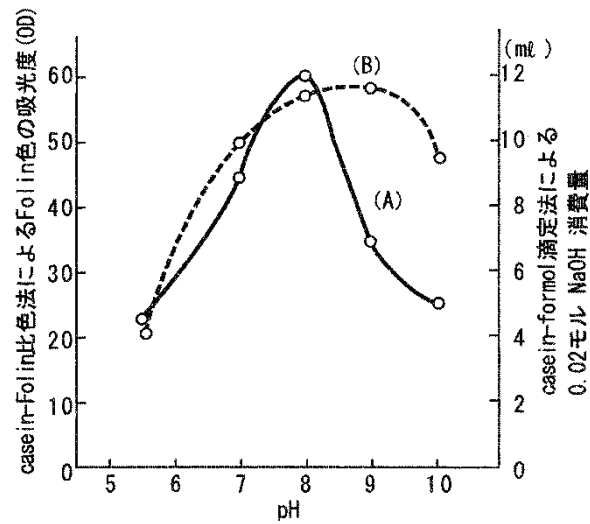
図3 温度に対する安定性



3. 至適 pH³⁾

アクチナーゼの酵素作用と至適 pH の関係は酵素活性の測定法によってやや異なりますが、概ね pH7～9 の範囲で高い酵素活性を示します(図4)。

図4 酵素活性とpH



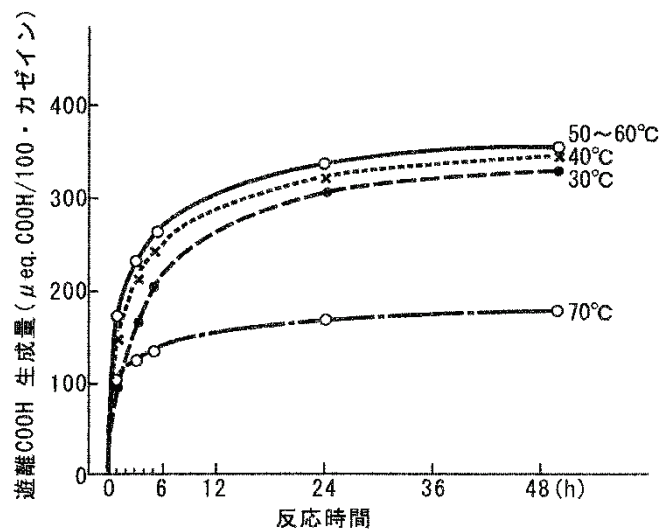
(A) casein-Folin 比色法による pH-活性度曲線

(B) casein-formol 滴定法による pH-活性度曲線

4. 至適温度⁴⁾

カゼインを基質とした場合のアクチナーゼの酵素活性と反応温度との関係は図5に示すように、40～60℃ の範囲で高い酵素活性を示します。

図5 酵素活性と反応温度



基質：5%カゼイン溶液 (pH7.4)。

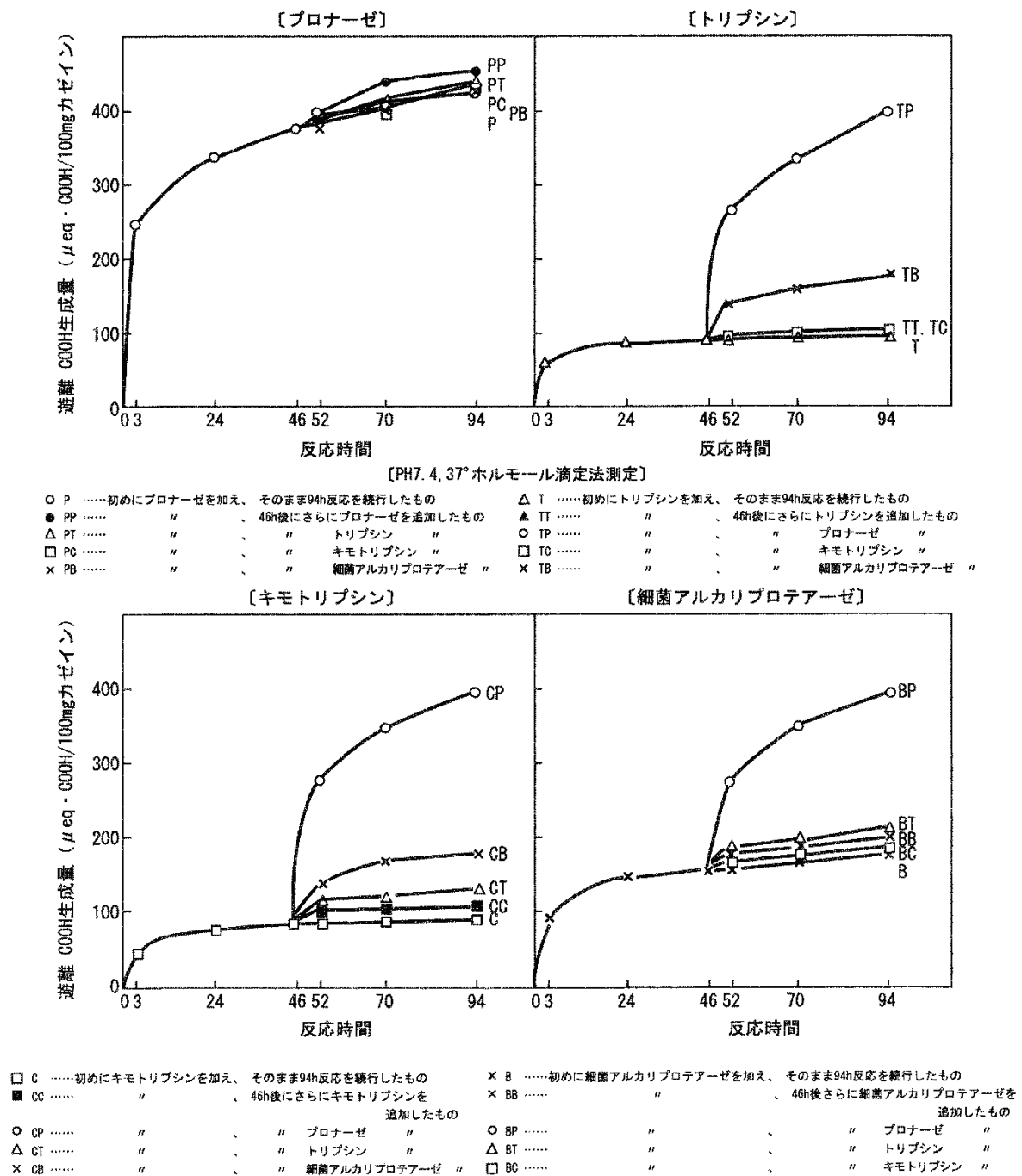
酵素添加量：170,000 PU/100g カゼイン。

測定：casein-formol滴定法。

5. 基質特異性⁵⁾

トリプシン、キモトリプシン等のタンパク質分解酵素は、それぞれ特有の基質特異性を有し、特定のペプチド結合のみ加水分解しますが、アクチナーゼは各種基質に対し極めて広範な加水分解力を有しているため、タンパク質の各種ペプチド結合に作用し、タンパク質分解産物は各種のペプチド類にとどまらず、多量の各種アミノ酸が遊離してきます。アクチナーゼとトリプシン、キモトリプシンおよび細菌アルカリプロテアーゼとの交叉試験の結果は図6に示すとおりです。

図6 各種タンパク質分解酵素との交叉試験



6. タンパク質加水分解度⁴⁾

アクチナーゼは広範な基質特異性を有しているため、各種タンパク質を効率よく加水分解します。カゼインに対する各種タンパク質分解酵素の加水分解度を比較すると、アクチナーゼは強力なタンパク質分解力を有することがわかります(表2)。

表2 カゼインに対する各種タンパク質分解酵素の加水分解度の比較*

タンパク質分解酵素の種類	酵素添加量 (mg 酵素/g カゼイン)	遊離 COOH 生成量** (μ eq. COOH/100mg カゼイン)	相対的加水 分解度比
アクチナーゼ	7	360.0	100
トリプシン(結晶)	7	112.0	31
キモトリプシン(結晶)	7	76.0	21
ペプシン(粗製)	14	151.2	42
パパイイン(粗製)	70	136.0	38
〃	140	144.0	40
タカジアスターゼ	70	138.0	38
枯草菌プロテアーゼ(結晶)	7	196.0	54

* 反応条件 : 5%カゼイン溶液基質、pH7.4、40℃、72 時間分解。

** 測定 : casein-formol 滴定法。

7. 酵素活性阻害因子

アクチナーゼは次のような因子によって酵素活性の阻害を受けます。

熱、酸、アルカリ、血清、じゃがいも及び豆類の抽出液、濃厚な塩

塩化ナトリウムの影響については、9%食塩水で 14%、18%食塩水で 36%程度の活性阻害がみられますが、生理食塩水(0.9%)の使用はほとんど問題ありません。

8. 酵素力価の測定法 (Anson - 荻原氏変法)

(1) 原理

1. 乳製カゼイン溶液にアクチナーゼを作用させると、加水分解されてアミノ酸を生成する。
2. 一定時間作用後、トリクロル酢酸を加えて、未分解のタンパク質を沈殿させる。
3. ろ液にフォリン試薬を加えると、チロジンなどが発色する。
4. 発色液の 660nm における吸光度はアクチナーゼの力価に比例するので、チロジン 1 μ g のフォリン試薬による発色の吸光度と対比して力価を算出する。

(2) 定義

カゼイン基質に pH7.4、40℃で酵素を作用させた時、1 分間にチロジン 1 μ g に相当する分解生成物を生ずる酵素量を 1 チロジン単位(PU)とする。

(3)測定操作

1) 試料溶液の調製

酵素試料に pH7.4 リン酸塩緩衝液を加えて溶かし、5～10PU/mL(推定)となるようにする。この液を試料溶液とする。

2) チロシン標準溶液の調製

消化力試験用チロシン標準品(医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団)を 105℃で 3 時間乾燥し、その 0.125g を正確に量り、0.2mol/L 塩酸試液に溶かし、正確に 100mL とする。この液 2mL を正確に量り、0.2mol/L 塩酸試液を加えて正確に 100mL とする(25 μg/mL)。用時製する。

3) 基質溶液の調製

乳製カゼイン(別途 105℃、2 時間で乾燥減量を測定しておく)1.0g に対応する量を正確に量り、pH7.4 のリン酸塩緩衝液 40mL を加え、水浴中で加温して溶かす。冷後、希水酸化ナトリウム試液を加えて、pH を正確に 7.4 に調整した後、pH7.4 のリン酸塩緩衝液を加えて、正確に 50mL とする。40℃に加温して用いる。用時製する。

4) 操作法

試料溶液 1mL を正確に量り、40±1℃で 5 分間放置した後、基質溶液 1mL を正確に加え、直ちによく振り混ぜる。この液を 40±1℃で正確に 10 分間放置した後、トリクロロ酢酸溶液 2mL を正確に加え、振り混ぜ、再び 40±2℃で 20 分間放置した後、ろ紙でろ過する。ろ液 1mL を正確に量り、無水炭酸ナトリウム溶液 5mL を正確に加え、振り混ぜ、次いで薄めたフォリン試液(1→3)1mL を正確に加え、よく振り混ぜ、40±2℃で 20 分間放置する。この液につき、水を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を行い、波長 660nm における吸光度 A_1 (試料反応ろ液吸光度)を測定する。別に試料溶液 1mL を正確に量り、トリクロロ酢酸溶液 2mL を正確に加え、振り混ぜた後、基質溶液 1mL を正確に加え、40±2℃で 20 分間放置し、以下同様に操作して吸光度 A_2 (盲検ろ液吸光度)を測定する。またチロシン標準溶液 1mL を正確に量り、無水炭酸ナトリウム溶液 5mL を正確に加え、振り混ぜた後、薄めたフォリン試液(1→3)1mL を正確に加え、よく振り混ぜ、以下試料溶液と同様に操作して吸光度 A_3 (チロシンの吸光度)を測定する。別に 0.2mol/L 塩酸試液 1mL を正確に量り、同様に操作して吸光度 A_4 (チロシンブランクの吸光度)を測定する。

(4)力価表示法

チロシン標準液の吸光度 = (チロシンの吸光度 A_3 - チロシンブランクの吸光度 A_4)

$$\text{酵素力価 (PU/g)} = \frac{\{(\text{試料反応ろ液吸光度 } A_1) - (\text{盲検ろ液吸光度 } A_2)\} \times \text{希釈倍数} \times 4/10}{(\text{チロシン標準液の吸光度}) \times 1/25 \times \text{試料採取量 (g)}}$$

(5) 試 液

・pH7.4 のリン酸塩緩衝液

リン酸二水素カリウム 1.80g、無水リン酸水素二ナトリウム 7.57g に水 50mL を加え、これをあらかじめ酢酸カルシウム一水和物 0.035g を水 900mL に溶かした液に加え、更に水を加えて 1000mL とする。

・トリクロロ酢酸溶液

トリクロロ酢酸 1.63g 及び酢酸ナトリウム 2.72g に酢酸(100) 1.20g 及び水を加えて溶かし 100mL とする。40℃に加温して用いる。

・無水炭酸ナトリウム試液

無水炭酸ナトリウム 4.24g を水に溶かし、100mL とする。

・薄めたフォリン試液(1→3)

タングステン酸ナトリウム 20g、モリブデン酸ナトリウム 5g 及び水約 140mL を 300mL のフラスコに入れ、これに薄めたリン酸(17→20) 10mL 及び塩酸 20mL を加え、すり合わせの環流冷却器を付け、10 時間穏やかに煮沸する。次に温かいうちに、硫酸リチウム 30g 及び水 10mL を加え、更に臭素ごく少量を加えて濃緑色の液を黄色とし、冷却器を付けず 15 分間煮沸して過量の臭素を除く。冷後、水を加えて 200mL とし、ガラスろ過器(G4)でろ過し、この液を水で 3 倍に希釈する。

9. アクチナーゼの貯法

アクチナーゼは乾燥した冷所に保存して下さい。特に開封後は吸湿しないよう注意して下さい。

10. アクチナーゼの脱 Ca 法

アクチナーゼには安定剤として酢酸カルシウムが添加されていますので、これを除去する必要がある場合には、Sephadex G-25 で脱塩透析して下さい。また、アクチナーゼをリン酸緩衝液に溶解するとリン酸カルシウムの白色沈殿を生じますので、ろ過して除去することができます。ただし、アクチナーゼが不安定になりますのでなるべく低温下で迅速に処理して下さい。

11. アクチナーゼの無菌化法

アクチナーゼはアルコールに対してかなり安定ですので、70%アルコール水で 10 分間処理すると無菌酵素が得られます。

Ⅲ. アクチナーゼの用途(試薬)

1. タンパク質の構造研究^{6~19)}

ヘモグロビン、タカアミラーゼ、仔牛胸腺ヒストン、リボヌクレアーゼ、馬および仔牛心筋チトクローム C、オボアルブミン、オボムコイド等の構造研究において、その構成アミノ酸の分離のために使用されています。また、核内封入体、チュブリン重合体、ヒト免疫グロブリン等の構造解析や、ヒトアルブミン上のペニシリン結合部位の同定にも使用されています。

2. 赤血球の構造、機能研究^{20~27)}

ヒト赤血球にアクチナーゼを作用させて起こる変化から、赤血球膜のタンパク質構造と透過性に関する部位の位置関係を解析したり、ヒト赤血球の NAD (NADP) スクレオシターゼの不活化、ヒト赤血球のゴーストの誘導、赤血球凝集活性、人血の証明等に使用されています。

3. 各種糖タンパク質からの糖ペプチド分画の精製、分離^{28~31)}

婦人の成熟乳から得た人乳カゼインの糖タンパク質成分(P-1分画)をアクチナーゼで分解することにより、ビフィズス菌増殖能を持つ3つの糖ペプチド分画が得られます。この分解能は、パパイン、プロメラインよりも優れています。また、レクチン、魚類表皮粘質物、ハプトグロビン等から得られた糖ペプチドの構造解析等にも利用されています。

4. 生体組織中の非タンパク質の抽出^{32~41)}

生体組織中に存在しているムチン、ムコタンパク質、ムコ多糖類などのように酵素分解が困難と考えられていた物質にもアクチナーゼはかなり作用しますので、生体成分抽出時の前処理にアクチナーゼを使用することができます。

5. 細胞培養^{42~50)}

組織培養のための細胞分散の目的に 0.001~1.0%のアクチナーゼを使用するとトリプシンと同等もしくはより良好な結果が得られます。また、胃や脾臓のように粘液物質がある場合にはコラゲナーゼやパンクレアチンを併用すると効果的です。さらに、細胞融合を行う際、電場にさらす前に細胞をアクチナーゼ処理すると融合収率が高まります。この他、減数分裂を中断させたマダニ卵母細胞をアクチナーゼと共に培養すると減数分裂の続行がみられます。マウスの非腫瘍性 3T3 線維芽細胞では、細胞分裂、成長の続行がみられます。

6. 抗原の分離、解析^{51~57)}

CEA 分子中の 3 種類の抗原性部分は、ペプシン処理では破壊されてしまいますが、アクチナーゼ処理では、NFA、NCA を破壊することなく分離することが可能です。

イネ白葉枯病菌多糖体の抗原分離、細胞膜上の受容体やイオンチャンネル等の機能、活性、分布を調

べるために、細胞のアクチナーゼ処理が行われています。

7. 高タンパク質食品中のビタミン B₁、B₂、油性天然色素の定量^{58~60)}

大豆、納豆、豚肝臓、豚肉、牛乳や粉乳等の高タンパク質食品中のビタミン B₁、B₂ の定量の際、アクチナーゼとタカジアスターゼとの前処理により、10~30%の検出量増加が期待できます。また、油性天然色素 (β カロテン等) の定量もアクチナーゼの前処理により可能になります。

8. ウイルスからの核酸の分離^{61~64)}

ウイルスから核酸を分離する際に、アクチナーゼと2-メルカプトエタノールおよび硫酸化ポリビニルあるいはドデシル硫酸ナトリウムで処理すると、核酸を変性させずに定量的に抽出できます。

9. 百日咳菌の感染防御抗原の抽出、精製⁶⁵⁾

百日咳菌に含まれる感染防御抗原を含む成分を抽出する際に、アクチナーゼ処理を行うことにより、有効成分を減弱することなしにヒスタミン感受性増強物質が除去され、感染防御抗原の抽出精製率が向上します。

10. 細菌細胞壁の溶解⁶⁶⁾

A 群連鎖球菌細胞壁をアクチナーゼで溶解することにより、温和な条件下でも細胞壁から群特異性多糖が分離できます。

11. 薬剤の吸収促進および透過性亢進^{67~69)}

ラット小腸ループにビタミン B₁₂-⁵⁷Co と共にアクチナーゼを注入するとビタミン B₁₂ の吸収が促進されます。また、ヒメダカ胚心臓による強心配糖体の微量定量の際、アクチナーゼ前処理により、卵膜および胚表膜の透過性亢進がみられます。

12. 特異免疫反応の増強^{70、71)}

抗免疫グロブリン無反応性の未熟 B 細胞をアクチナーゼで処理した後、抗体と培養すると増殖促進がみられます。また、細胞診の酵素抗体法を応用するにあたり、アクチナーゼ処理により特異免疫反応の増強がみられます。

13. その他^{72、73)}

アクチナーゼで消化し、粘度の低下あるいは除去することによって、喀痰中の細胞分離、卵白中の残留抗生物質の定量、リンパ球計数等が容易になります。

IV. アクチナーゼの用途(食品加工品・工業用)

アクチナーゼは、放線菌 *Streptomyces griseus* の培養ろ液から得られるタンパク質分解酵素で、食品加工用と工業用の製品があります。

製品名	力価(チロジン単位/g)	用途	包装単位
アクチナーゼ AS	250,000	食品加工用	100g、500g
アクチナーゼ AF	250,000	工業用	100g、500g

アクチナーゼは、各種基質タンパク質に対して強力な加水分解力を示し、タンパクのペプチド結合を高率に加水分解します。また、酸分解と比較して反応条件が温和なため、アクチナーゼの応用分野は広く、いろいろな方面で使用されています。

1. 混合アミノ酸の製造^{74、75)}

アクチナーゼはタンパク質を遊離アミノ酸にまで分解しますので、混合アミノ酸の製造に有効です。しかも、酸分解では分解されやすいトリプトファンやメチオニン等が完全に保持されますので、栄養的に優れた製品が得られます。大豆カゼインや乳カゼイン、魚肉等の原料タンパク質に対しては、1%のアクチナーゼを添加して pH6～8、35～50℃で 24～48 時間分解します。防腐のためには3%エタノールを添加します。

魚肉液化タンパク質等のように、アミノ酸にまで分解する必要のない場合には、50～60℃、4～6時間の分解で液化することができます。

2. フィッシュ・ソリューブル、魚醤油の製造^{76、77)}

内臓を含む全魚体にアクチナーゼを添加して分解すると、アミノ態窒素含量の多いフィッシュ・ソリューブルが短時間で得られます。

また、「しょつる」のような魚醤油の速醸にも使用できます。この場合には、初期の酵素分解期間中は食塩を 10%とし、熟成期に食塩を増量して腐敗を防止します。

3. 食肉の液化および軟化^{78、79)}

アクチナーゼは食肉の pH(約 pH6)でもよく作用しますので、肉エキスの製造に使用できます。分解産物のうち、ある種のペプチドが苦味を発現する場合がありますので、分解率を抑えて液化のみにとどめるか、またはパンクレアチン等と併用してアミノ態窒素含量を高めるか、いずれかの方法をとります。

軟化を目的とする場合には、先ず低温でアクチナーゼ液を肉組織中に浸透させ、その後に加温します。この際、針などで小さな穴を多数あけるなどして酵素の浸透を助長することは有効です。

4. パン製造⁸⁰⁾

アクチナーゼを原料小麦粉に対して 10～15ppm 添加し、アーカデイタイプのイーストフードと併用すると、

ミキシング時間と発酵時間を短縮し、製品の仕上がりをソフトにして、表面の焼き上がりも良好になります。

アクチナーゼは耐熱性が強いいため窯伸びが良好ですから、窯入れをやや早めにする必要があります。通常の窯入れでは窯落ちする場合があります、また、アクチナーゼの使用量が多すぎるとドウがだれる原因となります。

5. クラッカー、ビスケット製造^{81、82)}

アクチナーゼを原料小麦粉に対して 15～30ppm 添加することにより、ミキシング時間と発酵時間を短縮し、製品の歯ざわりを良好にします。なお、添加量が多すぎたり、発酵時間が長いとドウがだれるおそれがあります。

6. 味噌、醤油製造^{83、84)}

蒸煮大豆を放冷する工程でアクチナーゼを添加し、効率良くタンパク質分解を行ったのちに麴、食塩と混合して熟成工程に移します。2～3時間温醸することにより熟成が促進して、濃厚な旨味を有し、品質の優れた製品が短時間で得られます。

7. 皮革の良質化^{85、86)}

アクチナーゼで皮革を処理するとエラスチンは急速に消化されますが、コラーゲンの消化は比較的穏やかですから、皮革の脱灰工程で添加すると良質の皮革が得られます。

8. コラーゲン、ゼラチンの良質化^{87、88)}

弱アルカリ性下で皮革にアクチナーゼを作用させると可溶化コラーゲンが得られます。しかもテロペプチドと呼ばれる抗原性の主要因子は切断されているために、医療材料として優れたコラーゲンが得られます。

また、アクチナーゼで可溶化したコラーゲンを加熱すると分子量のそろった良質のゼラチンが得られます。

文 献

- 1) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの研究(第五報)，理化学研究所報告，35：90，1959.
- 2) 杉山幸雄ほか：科研製薬㈱社内資料.
- 3) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの研究(第四報)，理化学研究所報告，35：84，1959.
- 4) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの研究(第六報)，理化学研究所報告，35：154，1959.
- 5) 荏司知志ほか：科研製薬㈱社内資料.
- 6) Sasakawa, S., et al : Studies on hemoglobin; II. Arginine containing peptides from the hydrolysate by *Streptomyces griseus* protease, *J. Biochem.*, 45 : 867, 1958.
- 7) Ikenaka, T.: Chemical modification of Taka-amylase A; II. Phenylazobenzoylation of Taka-amylase A, *J. Biochem.*, 46 : 297, 1959.
- 8) Tsugita, A., et al : The structure of glycopeptides obtained from Taka-amylase A. *J. Biochem.*, 46 : 695, 1959.
- 9) Satake, K., et al : Arginine peptides obtained from thymus histone fractions after partial hydrolysis with *Streptomyces griseus* proteinase, *J. Biol. Chem.*, 235 : 2801, 1960.
- 10) Takahashi, K. : The structure and function of ribonuclease T₁ ; III. Amino- and carboxyl-terminal sequences of ribonuclease T₁ J. *Biochem.*, 52 : 72, 1962.
- 11) Titani, K., et al : N-terminal sequence in beef- and horse-heart cytochrome C, *J. Biochem.*, 51 : 350, 1962.
- 12) Satake, K., et al : Several types of limited proteolysis of native ovalbumin catalyzed by a protease from *Streptomyces griseus*, *J. Biochem.*, 55 : 466, 1964.
- 13) Nomoto, H., et al : Preparation and characterization of fragment glycoasparagines from ovalbumin glycopeptides, *Carbohydr. Res.*, 107 : 91, 1982.
- 14) Kanamori, M., et al : *Agr. Biol. Chem.*, 33 : 220, 1969.
- 15) Conchie, J., et al : The carbohydrate units of asialo-ovomucoid : Their heterogeneity and enzymic degradation. *Carbohydr. Res.*, 112 : 261, 1983.
- 16) 重村克己ほか：核内封入体の組織化学的性状について，岐阜県立下呂温泉病院・温泉医学研究所年報 No. 14 : 35, 1987.
- 17) Serrano, L., et al : Effect of specific proteolytic cleavages on tubulin polymer formation, *Biochem. J.*, 252 : 683, 1988.
- 18) Jehanli, A., et al : Pronase and proteinase K digestion of human immunoglobulin, M, *Mol. Immunol.*, 22 : 557, 1985.
- 19) Lafaye, P, et al : Location of penicilloyl groups on CNBr fragments of the albumin from penicillin-treated patients, *FEBS Lett.*, 220 : 206, 1987.
- 20) 竹下正純：プロナーゼ処理による人赤血球膜の構造と機能の変化について，日本血液学会雑誌，35 : 285, 1972.
- 21) Kirikae, T., et al : Identification of Re lipopolysaccharide-binding protein on murine erythrocyte membrane, *Microbiol. Immunol.*, 32 : 33, 1988.
- 22) 木村邦彦ほか：ヒト赤血球の各種レクチンレセプターに対するプロナーゼの作用，医学と生物学，108 : 35, 1984.
- 23) Viitala, J., et al : Blood group A and H determinants in polyglycosyl peptides of A₁ and A₂ erythrocytes, *Eur. J. Biochem.*, 126 : 401, 1982.
- 24) Laster, Y., et al : Viral and non-viral induced fusion of pronase-digested human erythrocyte ghosts, *Biochim. Biophys. Acta (NLD)*, 551 : 282, 1979.
- 25) Sugii, S., et al : Hemagglutinating activity of the heatlabile enterotoxin isolated from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 49 : 183, 1988.
- 26) Marx, A., et al : Pronase treated erythrocytes in passive hemagglutination, *Rev. Roum. Biochim.*, 17 : 193, 1980.
- 27) 梶崎裕志ほか：抗ヒト $\alpha 1$ -AT 血清ならびに抗ヒト赤血球膜血清を用いた腐敗血痕からの人血証明 人・獣鑑別に関する法医学免疫学的研究，日本法医学雑誌，42 : 311, 1988.
- 28) 柏井洋臣：人乳カゼイン糖蛋白分画のプロナーゼ水解で得られる糖ペプチドとそのビフィズス菌増殖能について，日本小児科学会，83 : 403, 1979.
- 29) Kimura, Y., et al : Isolation of glycopeptides from *Ricinus communis* lectins., *Agric. Biol. Chem.*, 52 : 1771, 1988.

- 30) Nakagawa, H., et al : 各種魚類粘液糖タンパク質の糖鎖の多様性, 日本水産学会誌, 54 : 1653, 1988.
- 31) Delers, F., et al : Glycosylation of chicken haptoglobin., *Biochem. Cell Biol.*, 66 : 208, 1988.
- 32) Hashimoto, T., et al : Action of proteolytic enzymes on purified bovine submaxillary mucin, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 106 : 233, 1963.
- 33) Cook, G. M. W., et al : Separation of the M and N blood group antigens of the human erythrocyte., *Biochim. Biophys. Acta.*, 101 : 57, 1965.
- 34) Ohkuma, S., et al : Action of Pronase on M and N Antigens on Human Erythrocytes, *Proc. Japan Acad.*, 42 : 661, 1966.
- 35) Ohkuma, S., : MN Blood-group active sialoglycopeptides released from human erythrocytes by pronase treatment, *Biochim. Biophys. Acta.*, 147 : 169, 1967.
- 36) Yamauchi, T., et al : The amino acid sequences, the peptide-carbohydrate linkages, and the composition and size of the polysaccharide unit of the glycopeptides from α_1 -acid glycoprotein of human plasma, *J. Biochem.*, 64 : 683, 1968.
- 37) Mintz, B. : Experimental study of the developing mammalian egg ; removal of the zona pellucida, *Science*, 138 : 594, 1962.
- 38) Gwatkin, R. B. L., et al : Synthesis of a Ribonucleic acid virus by the mammalian ovum., *Nature*, 209 : 993, 1966.
- 39) 橋本かず : ムコ多糖体性血液型物質の生化学的研究(X I X), *生化学*, 39 : 79, 1967.
- 40) 今井清勝 : 培養軟骨細胞におよぼすパパインおよび他の酵素の影響, *横浜医学*, 19 : 99, 1968.
- 41) Jibril, A. O. : Proteolytic degradation of ossifying cartilage matrix and the removal of acid mucopolysaccharides prior to bone formation, *Biochim. Biophys. Acta.*, 136 : 162, 1967.
- 42) 新津泰孝ほか : 組織培養に用いた *Streptomyces griseus* プロテアーゼ, *医学と生物学*, 66 : 174, 1963.
- 43) 新津泰孝ほか : 組織培養における *Streptomyces griseus* プロテアーゼの使用, *抗酸菌病研誌*, 16 : 323, 1963.
- 44) 山根 績ほか : 組織培養のための種々臓器内細胞遊離法の検討, *医学と生物学*, 68 : 104, 1964.
- 45) Gwatkin, R. B. L., et al : A new method for dispersing the cells of mammalian tissues, *Nature*, 201 : 1242, 1964.
- 46) Niitu Y., et al : Use of a protease of *Streptomyces griseus* in tissue culture, *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.-C*, 12 : 90, 1965.
- 47) 田中啓二ほか : 細胞単離 肝細胞単離法, *生体の科学*, 37 : 382, 1986.
- 48) Zimmermann, U., et al : Electric-fieldstimulated fusion : Increased field stability of cells induced by pronase, *Naturwissenschaften*, 68 : 577, 1981.
- 49) Osanai, K., et al : Pronase P induces the resumption of meiosis in oyster oocytes, *Bull. Mar. Biol. Stn. A-samushi Tohoku Univ.*, 18 : 37, 1988.
- 50) Burger, M. , : Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth., *Nature*, 227 : 170, 1970.
- 51) Matsuoka, Y., et al : Proteolytic release of antigenic fragments corresponding to normal fecal antigen and non-specific crossreacting antigen from carcinoembryonic antigen, *Int. J. Cancer*, 21 : 604, 1978.
- 52) Choi, J. E., et al : イネ白葉枯病菌多糖質の抗原分析, *日本植物病理学会報*, 47 : 199, 1981.
- 53) Molner, J., et al : Evidence for the recycling nature of the fibronectin receptor of macrophages, *J. Cell Physiol.*, 131 : 374, 1987.
- 54) Gordon, IR., et al : Mouse interferon receptors : A difference in their response to α and β interferons, *J. Gen. Virol.*, 64 : 2777, 1983.
- 55) Cosio, F. G., et al : The human FcR III. Effects of pronase on soluble immune complex binding by polymorphonuclear leucocytes, monocytes and pulmonary macrophages, *Immunology*, 46 : 395, 1982.
- 56) West, N. B., et al : A specific estrogen receptor in the mouse spleen, Characterization and evidence of physiological regulation, *J. Steroid Biochem.*, 16 : 557, 1982.
- 57) Starkus, J. G., et al : Kinetic analysis of sodium channel block by internal methylene blue in pronased crayfish giant axons, *Biophys. J.*, 46 : 205, 1984.

- 58) 佐野久子ほか：食品中ビタミン含有量の検討；Ⅱ．数種動物 植物食品中のビタミン B₁, B₂ 量, 家政学雑誌, 18 : 357, 1967.
- 59) 伊藤長生ほか：調整粉乳のビタミン B₁ 定量についてⅠ．蛋白消化酵素で前処理する定量法, ビタミン, 36 : 142, 1967.
- 60) 天川映子ほか：高速液体クロマトグラフィーによる食品中の油性天然色素の定量, 分析化学, 33 : 586, 1984.
- 61) Pfau, C. J., et al : Release of deoxyribonucleic acid from vaccinavirus by 2—mercaptoethanol and pronase, Nature, 194 : 894, 1962.
- 62) Rathlev, T., et al : The nucleic acid from Reiter's Treponemes, Arch. Biochem. Biophys., 106 : 343, 1964.
- 63) Shepherd, R. J., et al : DNA in Cauliflower mosaic virus, Virology, 36 : 150, 1968.
- 64) Shepherd, R. J., et al : Double-stranded DNA from Cauliflower mosaic virus., Virology, 41 : 339, 1970.
- 65) 春日忠義ほか：百日咳菌の感染防御抗原の抽出精製法, 公開特許公報, 昭 43-10866.
- 66) Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 14 : 38, 1978.
- 67) Okuda, K.: Enhanced Vitamin B₁₂ absorption from rat intestine by proteases, in the absence of intrinsic factor, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124 : 79, 1967.
- 68) 山鹿健次：プロナーゼのビタミン B₁₂ 吸収におよぼす影響に関する研究, ビタミン, 39 : 77, 1969.
- 69) Ito, R., et al : Micro-determination of cardiac glycosides by means of the embryonic heart of Japanese Killfish, *Oryzias latipes* VIII) Pre-treatment with a new type protease, pronase., 東邦医学会雑誌, 7 : 1201, 1961.
- 70) 椎名義雄ほか：細胞診への酵素抗体法の応用 酵素抗体間接法における pronase 消化効果, 日本臨床細胞学会雑誌, 22 : 218, 1983.
- 71) Gollapudi, S. V. S., et al : Nonresponsiveness of immature B lymphocytes to antiimmunoglobulin is reversed by pronase, Biophys. Res. Commun., 119 : 1, 1984.
- 72) 赤沼克也：Pronase 消化法による喀痰中腫瘍細胞診, 抗酸菌病研誌, 19 : 460, 1967.
- 73) Stewart, C., et al : A method for counting phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes., Blood, 29 : 628, 1967.
- 74) 後藤富雄ほか：混合アミノ酸の製造方法, 公開特許公報. 昭 57—16695.
野本正雄ほか：放線菌蛋白分解酵素によるアミノ酸の製造法. 特許公報, 昭 33—9964.
- 75) 三宅義章：魚類加工残滓の酵素処理による可溶化. 日本食品工業学会誌, 29 : 117, 1982.
- 76) 村山繁雄ほか：魚醤油の製造に関する研究—Ⅰ；魚醤油製造時における酵素剤添加の影響. 東海水研報, 32 : 155, 1962.
- 77) 浅野元一ほか：秋田県特産食品の研究Ⅱ；しょつづつる連醸条件の検討. 秋田大教研紀, 19 : 85, 1969.
- 78) 大高文男ほか：二、三の蛋白分解酵素剤による牛肉の人工消化. 日本食品工業会誌, 12 : 101, 1965.
- 79) 中川禎人：酵素処理による蓄肉の軟化について. 広島食品工試研究報告, 11:54, 1970.
- 80) 佐藤友太郎ほか：農産加工技術研究会第7回大会(昭和 35.4)講演.
- 81) 木咲 弘ほか：酵素剤によるドウの軟化とビスケットの性質. 同志社女子大年報, 14 : 414, 1963.
- 82) 木咲 弘ほか：性状および香氣におよぼすプロテアーゼの添加の影響—ビスケットの香氣成分—(その4). 同志社家政, 11 : 32, 1977.
- 83) 野本正雄ほか：放線菌プロテアーゼの利用に関する研究(第1報)；味噌醸造への利用について. 日本農芸化学会誌, 34 : 430, 1960.
- 84) 好井久男ほか：プロテアーゼ製剤の食塩耐性について. 醸造協会誌, 62 : 881, 1967.
- 85) 佐藤 泰：脱灰剤として放線菌プロテアーゼの利用について. 日本皮革技術協会誌, 5 : 48, 1959.
- 86) 豊田春和ほか：皮コラーゲンに対する放線菌プロテアーゼの作用(第一報)；皮コラーゲンの消化に及ぼす処理条件の影響. 皮革化学, 15 : 45, 1969.
- 87) 加藤侃明：止血用コラーゲン粉末の製造法. 公開特許公報, 昭 56—25113.
- 88) Fujii, T., An enzymatic method of producing gelatin., Bull. Sco. Sci. Photo. Japan, No.16:30, 1966.

—— アクチナーゼに関する問い合わせ先 ——

〒113-0021 東京都文京区本駒込二丁目 28 番8号

科研ファルマ株式会社

電 話 03-5977-5096

F A X 03-5977-5082