

カルボキシペプチダーゼ A (CPase-A) によるペプチドの C-末端アミノ酸配列の解析

土井 和子, 上田 智, 原野 恵子*, 原野 昭雄**

タンパク質やペプチドのアミノ酸配列決定は N-末端から解析する Edman 法や DABITC 法がよく使用されているが C-末端からアミノ酸配列を決定する Carboxypeptidase (CPase) 法も有益な方法と考え、 β 鎖グロビンの C-末端領域のアミノ酸配列決定に応用してみた。CPase-A の β 鎖グロビンとの酵素反応モデルを Michaelis-Menten 式 (M-M 式) を基にし、パソコンを用いて組み立てた。[S]=基質濃度, K_m =ミカエリス定数, V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)=最大 CPase-A 活性値, C-末端アミノ酸による CPase-A 相対活性係数 K の 4 つをパラメーターとして使用した。このモデルを用い分析した各反応時間での CPase-A によるアミノ酸遊離量を予測値として算出した。正常 β^A 鎖グロビンと CPase-A との反応によって遊離されるアミノ酸量と予測値の間にはよい一致がみられた。また、この方法を異常ヘモグロビンに応用した結果、C-末端領域のアミノ酸配列決定に有効な手段となることを示した。

(平成 3 年 7 月 5 日採用)

Analysis of the Amino Acid Sequence in the C-Terminal Region of Peptides by Carboxypeptidase-A (CPase-A)

Kazuko Doi, Satoshi Ueda, Keiko Harano* and Teruo Harano**

Although both the Edman method and the DABITC method are well-known procedures for amino acid sequencing of the N-terminal of proteins and peptides, the CPase method, which is an analytical method for amino acid sequencing of the C-terminal of the substrate, is considered to be most useful for structural analysis of the C-terminal region. In the present study, we adapted this method to an analysis of the C-terminal region of the β -globin chain. A CPase-A reaction model between β -globin, which was based on the Michaelis-Menten equation, was constructed with a personal computer. Four parameters were prepared, namely, S (substrate concentration), K_m (Michaelis' constant), V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$, maximum CPase-A activity), and K (relative activity factors of CPase-A according to C-terminal amino acids). The estimated amino acid values released from the C-terminal position of the substrate at the various period of times corresponded well to the actual analyzed values in the normal β^A -globin chain. Application of this method to the structural

川崎医療短期大学 臨床検査科
〒701-01 倉敷市松島316

Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions : 316 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

* 川崎医療福祉大学 臨床栄養科

Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Profession, Kawasaki University of Medical Welfare

** 川崎医科大学 生化学教室

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

analysis of abnormal hemoglobins having a β -globin chain anomaly demonstrated it to be a useful technique for amino acid sequencing of the C-terminal region of β -globin chain. (Accepted on July 5, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17 (2) : 159-166, 1991

Key Words ① Carboxypeptidase (CPase) ② Amino acid sequencing
③ C-terminal region of peptides
④ Estimation of released amino acid

はじめに

タンパク質やペプチドのC-末端領域のアミノ酸配列の解析にCPase法^{1,2)}が知られているが、N-末端アミノ酸分析法であるフェニルイソチオシアネート法(Edman法)³⁾や4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-イソチオシアネート法(DABITC法)⁴⁾に匹敵するほど実用的な逐次解析法とは成っていない。これは、i) 反応に用いる酵素の純度—低純度による副反応物の出現、ii) C-末端アミノ酸へのCPaseの反応性の差異、iii) アミノ酸分析計の感度—酵素反応により遊離する微量アミノ酸の分析検出法の確立、iv) 操作の煩雑さ、など解決すべき問題点が多かったためであろう。しかし、今日では高純度の酵素試薬が容易に入手・使用できるようになり、微量アミノ酸分析装置の改良も行われ、また安価な高性能パーソナルコンピューターの出現により、酵素の基質特異性とその反応により遊離するアミノ酸量の実測や予測も行えるようになった。

今回我々はMichaelis-Menten式を基に、 β 鎖グロビンとCPase-Aの反応モデルを組み立て、C-末端領域のアミノ酸配列の決定を試みるとともに、C-末端領域にアミノ酸置換を持つ異常 β 鎖グロビンのアミノ酸配列の決定に応用した。

材料と方法

1. カルボキシペプチダーゼA (CPase-A) : カルボキシペプチダーゼA-DFP (16.3 mg Prot./ml, 53 unit/mg Prot. (pH 7.5, 25°C); Sigma)を用いた。使用前に本酵素をモルホリン緩衝液で希釈し、必要量を加えた。しかし、本

反応は37°Cで行ったため、酵素活性値は表示値の3.4倍として計算した。

2. モルホリン緩衝液: 200 mM N-エチルモルホリン-酢酸 (pH 8.5) 溶液。

3. ペプチドの調整: ヒトの赤血球から得た溶血液を塩酸-アセトンで処理し、グロビンを得た。このグロビンを8 M尿素-リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.75; Naイオン勾配: 5mM \rightarrow 35 mM)を溶離液としたCM-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ、 α 鎖、 β 鎖グロビンに分け、フラクションコレクターで分取した。各グロビンを透析・Sephadex G25カラムで精製し、ペプチド試料とした。

4. CPase-Aの酵素反応: 精製した β 鎖グロビン2.1 mg (133 nmol)を0.01N-NaOH 0.7 mlと、モルホリン緩衝液0.7 mlを加え溶解した。ついで予備加温後、グロビン:CPase-A=100:1(モル比)になるようにCPase-A溶液を加え、37°Cに加温した(グロビンの最終濃度: 94.5 nmol/ml)。一定反応(1, 2, 3, 4時間後)時間毎に反応液から200 μ lをとり、15%スルホサリチル酸溶液100 μ lを加え反応を停止させた。遠心(3000 rpm, 5min)し、上清100 μ lを全自動高速アミノ酸分析計(医理化工業: A-5500)を用い、遊離アミノ酸組成を求めた。

5. 遊離アミノ酸比率の算出: 正常 β^A 鎖グロビンの β 146Hisと β 143Hisは4時間のCPase-A反応で完全に遊離するので各アミノ酸遊離比率の算定にはHis分析値(nmol/ml)の1/2を基準にして算出した。

6. Cpase-Aのペプチドに対するアミノ酸遊離反応モデルの作製: 反応はMichaelis-Menten式に基づき各パラメーターとして最大酵素活性値 V_{max} 、ミカエリス定数: K_m 、基質濃

Table 1. Relative activity factors affected by the C-terminal and C2 position amino acids of the substrate used for released amino acid estimation with CPase-A enzymatic reaction

| C-末端アミノ酸 | | C末係数 相対活性値 (K1) a) | C2位係数 (K2) b) | C-末端アミノ酸 | C末係数 相対活性値 (K1) | C2位係数 (K2) |
|----------|-----|--------------------------|------------------|----------|-----------------------|---------------|
| 速い | Phe | 1.0 | 3 | 遅い | Asn | 0.015 |
| | Tyr | 1.0 | 3 | | Lys | 0.007 |
| 普通 | Leu | 0.3 | 1 | 非常に遅い | Gly | 0.0025 |
| | Val | 0.3 | 1 | | Asp | 0.0025 |
| | Ala | 0.3 | 0.9 | | Glu | 0.0001 |
| | His | 0.1 | 1 | 非分解 | Pro | 0 |
| | Gln | 0.1 | 1 | | | 0 |

- a) Relative CPase-A activity factors as phenylalanine 1.0, if presented at the C-terminal (C1) position of the substrate.
 b) Relative CPase-A activity factors, if the amino acid presented at the C2 position of the substrate.
 CPase-A activities were calculated with equation 1.
 CPase-A activity (v) = added CPase-A unit × K1 × K2 (1)
 unit = μmol/min

度：[S] をつぎのように設定した。

Michaelis-Menten 式：

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m}$$

1) [S]：CPase-A は C-末端アミノ酸として Pro, Arg をもつペプチドに作用しないため β 鎖グロビンでは β126Pro で反応は停止する (β127Val であるがこのアミノ酸も遊離しにくいと考えられる)。この反応過程において基質としての C-末端アミノ酸の種類は変わるが、全基質濃度の変化はない。すなわち [S] = 基質初濃度である。

2) Km 値：CPase-A に対する

Km 値は基質濃度により差異がある。⁵⁾ この分析実験では Km = 0.81 mM を採用した。

3) Vmax：CPase-A の反応速度は C-末端領域にあるアミノ酸によって影響を受ける^{1),2),6)} ので、C-末端より n-位のアミノ酸による CPase-A の最大活性値 [(Vmax)n = (CPase-A)n = μmol/min] を次のように想定した。

$$(V_{max})_n = (CPase-A)_n = u \times K1_n \times K2_{(n+1)}$$

u：十分な Phe 基質の存在下での CPase-A 活性値
 K1, K2：相対活性値係数

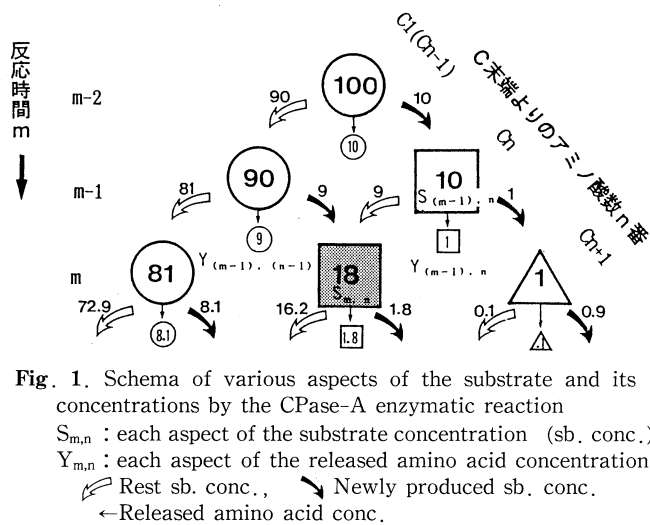


Fig. 1. Schema of various aspects of the substrate and its concentrations by the CPase-A enzymatic reaction
 Sm,n : each aspect of the substrate concentration (sb. conc.)
 Ym,n : each aspect of the released amino acid concentration
 ← Rest sb. conc., → Newly produced sb. conc.
 ← Released amino acid conc.

相対活性値係数 (K1,K2) はペプチドの C-末端アミノ酸の種類, Km 値, 基質濃度やアミノ酸分析の結果をもとにしてコンピュータによるシミュレーションを行い推定した (Table 1). K1, K2 はそれぞれ C 末端位または C 末より第 2 位にアミノ酸が存在した場合の CPase-A の相対活性値を示す。これらの結果から C-末端より n 位に位置するアミノ酸の遊離速度は [S] = 0.0954 mmol/l で分析したとき、次のように表される。

Table 2. Amino acid ratio (mol/mol) of the analytic and estimated values of normal β^A -globin, when hydrolyzed by CPase-A

| C-末端 アミノ酸(数) a) | CPA 1時間反応 | | CPA 4時間反応 | |
|--------------------|-----------|--------|-----------|-----|
| | 分析比 b) | 予測比 c) | 分析比 | 予測比 |
| His (2) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Tyr (2) | 1.9 | 1.2 | 2.0 | 1.9 |
| Lys (2) | 1.1 | 1.1 | 2.0 | 1.9 |
| Ala (6) | 3.2 | 3.4 | 5.5 | 5.8 |
| Leu (1) | 0.7 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Asn (1) | 0.6 | 0.9 | 0.9 | 1.0 |
| Val (3) | 1.3 | 1.5 | 2.6 | 2.9 |
| Gly (1) | 0.5 | 0.3 | 1.0 | 1.0 |
| Gln (2) | 0.9 | 0.3 | 1.9 | 1.8 |

S=75.7 nmol/ml, S : E=80.1 : 1
Enzyme reacted with substrate at pH8.5,
37°C

- a) Structural numbers of the amino acids in the C-terminal region of β^A -globin
b) Amino acid ratio of the analytic values of normal β^A -globin on the basis of C-terminal amino acid (His)
c) Amino acid ratio of the estimated values of normal β^A -globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

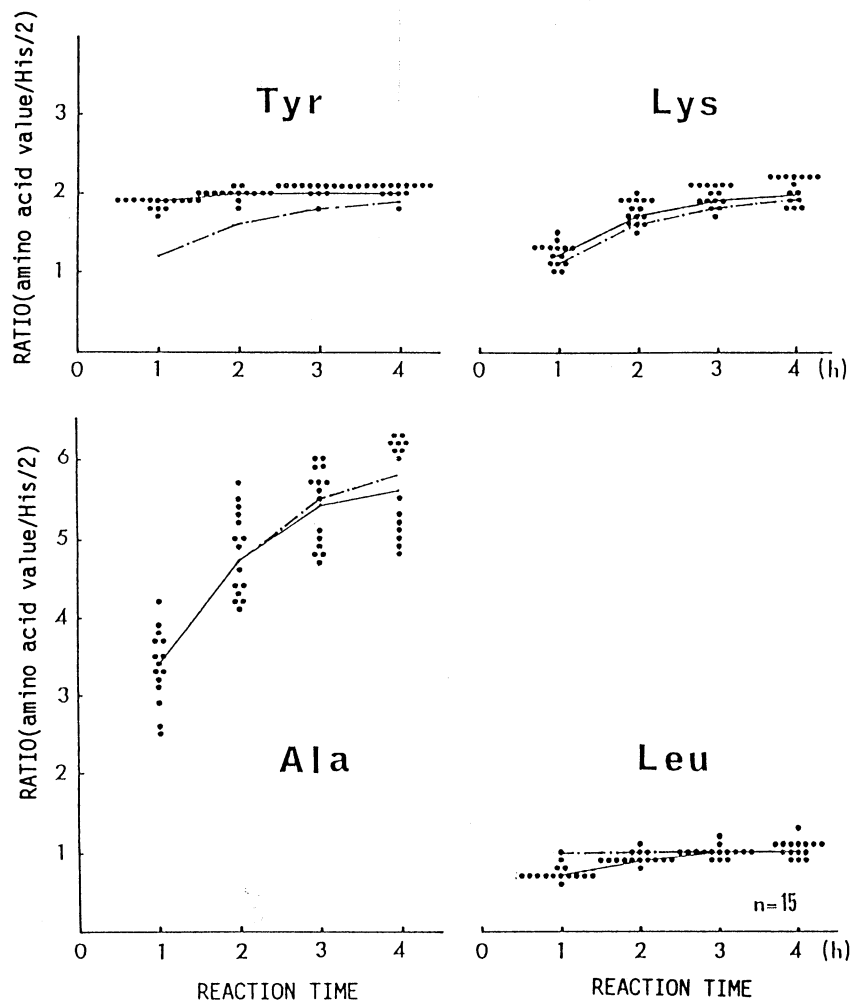


Fig. 2. Amino acid ratio (mol/mol) of the analytic and estimated values of C-terminal normal β^A -globins, when hydrolyzed by CPase-A

S=94.5 nmol/ml, S : E=100 : 1, Enzyme reacted with substrates at pH 8.5, 37°C

— : Mean amino acid ratio of the analytic values on the basis of C-terminal amino acid (His)

- - - : Amino acid ratio of the estimated values on the basis of C-terminal amino acid (His)

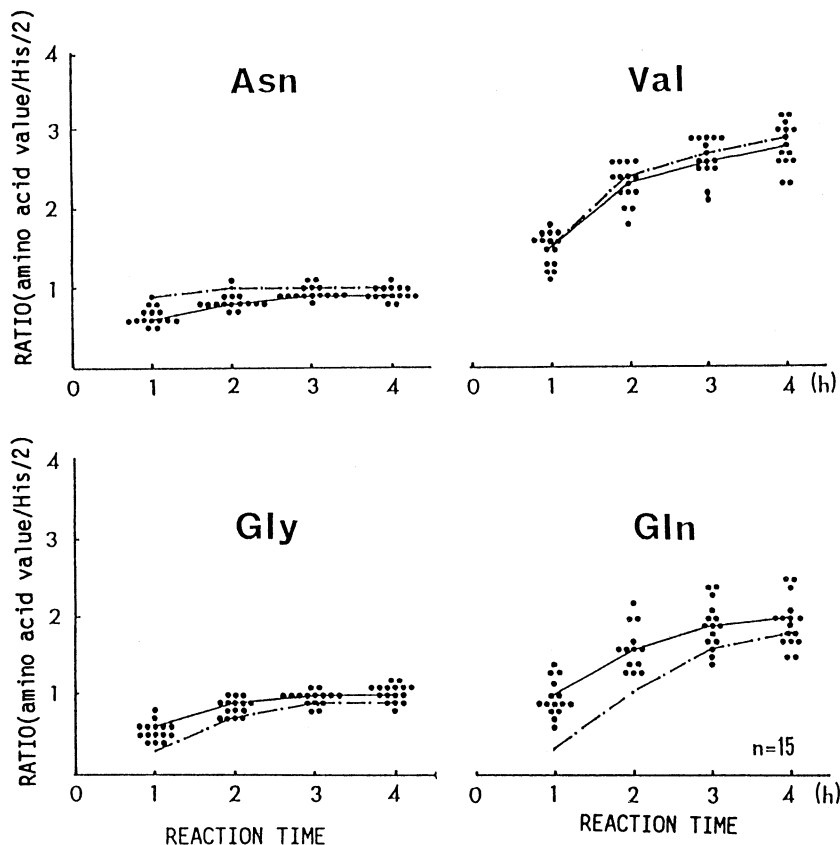


Fig. 3. Amino acid ratio (mol/mol) of the analytic and estimated values of C-terminal normal β^A -globins, when hydrolyzed by CPase-A
 S=94.5 nmol/ml, S : E=100 : 1, Enzyme reacted with substrates at pH8.5, 37 °C
 — : Mean amino acid ratio of the analytic values on the basis of C-terminal amino acid (His)
 - - - : Amino acid ratio of the estimated values on the basis of C-terminal amino acid (His)

$$V_n = \frac{(\text{CPase-A})_n \times [S]}{[S] + K_m} = (\text{CPase-A})_n \times 0.105$$

酵素反応に応じて新しく生成するペプチドの濃度や C-末端に現れるアミノ酸の種類は変化する。反応は段階的に進行するとして反応模式図を Figure 1 に示し説明する。m 段目の反応のとき、C-末端より n 位のアミノ酸を C-末端アミノ酸とするペプチドの濃度が $S_{m,n}$ であったとき、CPase-A により遊離するアミノ酸の生成量 $Y_{m,n}$ はつぎの式 1 で示される。

$$Y_{m,n} = V_n \times S_{m,n} / 0.0945 \dots \dots \text{(式 1)}$$

この式の中の $S_{m,n}$ は m 段目より 1 段前 (m-1 段目) の基質ペプチド濃度 ($S_{(m-1),n}$) および CPase-A によるアミノ酸遊離量 ($Y_{(m-1),(n-1)}$), ($Y_{(m-1),n}$)

などにより算出され、次の式 2 で示される。

$$S_{m,n} = Y_{(m-1),(n-1)} + S_{(m-1),n} - Y_{(m-1),n} \dots \dots \text{(式 2)}$$

この式 1, 式 2 から各段における遊離アミノ酸量および基質濃度の算定を行った。

結 果

今回標準ペプチドとして用いた正常 β^A 鎖グロビンの C-末端領域のアミノ酸は下記のようにである
 125 Pro- 126 Val- 127 Gln- 128 Ala- 129 Ala- 130 Tyr- 131 Gln- 132 Lys-
 133 Val- 134 Ala- 135 Gly- 136 Val- 137 Ala- 138 Asn- 139 Ala- 140 Leu-
 141 Ala- 142 His- 143 Lys- 144 Tyr- 145 His- 146 Val

C-末端 (β^{146}) His から β^{125} Pro または β^{126} Val まで CPase-A により順次アミノ酸が遊離さ

Table 3. Amino acid ratio of the analytic and estimated values of β -Mito globin, when hydrolyzed by CPase-A

| C-末端 アミノ酸(数) a) | CPA 1時間反応 | | | | CPA 4時間反応 | | | |
|--------------------|-----------|-------|---------|---------|-----------|------|------|------|
| | 正常 b) | 異常 c) | 予測 1 d) | 予測 2 e) | 正常 | 異常 | 予測 1 | 予測 2 |
| His (2) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Tyr (2) | 1.9 | 1.8 | 1.9 | ☆1.0 | 2.0 | 1.9 | 1.9 | ☆1.1 |
| Glu (1) | - | - | 0.1 | 0.0 | - | ★0.2 | 0.3 | 0.1 |
| Ala (6) | 3.2 | ★0.3 | 0.3 | ☆3.2 | 5.5 | ★1.4 | 1.3 | ☆4.2 |
| Leu (2) | 0.7 | ★0.2 | 0.1 | ☆1.0 | 1.0 | ★0.4 | 0.3 | ☆1.0 |
| Asn (1) | 0.6 | ★- | 0.1 | ☆0.9 | 0.9 | ★0.2 | 0.3 | ☆1.0 |
| Val (3) | 1.3 | ★0.2 | 0.1 | ☆1.6 | 2.6 | ★0.9 | 0.7 | ☆2.9 |
| Gly (1) | 0.5 | ★- | 0.0 | ☆0.4 | 1.0 | ★0.2 | 0.2 | ☆1.0 |
| Lys (1) | 1.1 | ★- | 0.0 | ☆1.0 | 2.0 | ★0.3 | 0.2 | ☆1.0 |
| Gln (2) | 0.9 | ★- | 0.0 | 0.0 | 1.9 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |

S=110.4 nmol/ml, S : E=104.2 : 1, Enzyme reacted with the substrate at pH8.5, 37°C

a) Structural numbers of the amino acids in the C-terminal region of β -Mito globin

b) Amino acid ratio of the analytic values of normal β^A -globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

c) Amino acid ratio of the analytic values of β -Mito globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

d) The amino acid ratio 1 of the estimated values of β 144Lys→Glu substituted globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

e) The amino acid ratio 2 of the estimated values of β 132Lys→Glu substituted globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

★: The amino acid ratio of the analytic values of β -Mito globin, differed from that of normal β^A -globin

☆: The amino acid ratio 2 of the estimated values of β 132 Lys→Glu substituted globin, differed from that of analytic values of β -Mito globin

れる。1時間と4時間における遊離アミノ酸量 (mol 比率) を **Table 2** に、また、各アミノ酸の1~4時間反応時点における遊離量の変動を15例について測定した (**Figs. 2, 3**)。1, 4時間反応後の分析値による mol 比率および CPase-A 反応モデルに基づいた遊離予測比率を記載した (**Table 2**)。構成数と分析比率を比較してみると全てのアミノ酸が4時間で完全に消化され遊離しているとはいえず、予測値は分析による比率に近い値として得られた。この CPase-A の反応条件下では4時間以上で反応は完結することを示しており、短時間反応でのアミノ酸遊離量を測定することによってアミノ酸配列を推測することが可能であることを示唆している。これらの結果を基にして各アミノ酸の CPase-A に対する活性係数 (K1, K2) を求め (**Table 1**)、各反応時点におけるアミノ酸量の予測量を算定した (**Table 2**)。1時間および4時間反応時に

における分析値と予測値とはよい一致がみられている。

この正常 β^A 鎖グロビンについての CPase-A 反応結果の有用性を確かめるために異常 Hb (Hb Mito [β 144Lys → Glu], Hb Yamagata [β 132Lys → Asn]) への応用を試みた。Tables 3, 4 に β^A の分析値との比較を示した。Hb Mito の場合 (**Table 3**) 1時間および4時間反応での分析値は His, Tyr の値を除き大きな差異がみられる。Lys の減少と C-末端領域にみられない Glu の出現が特徴的であり、 β 132または β 144Lys の Glu への置換が予想される。この想定をもとに予測値を算出すると表中の予測 1 または予測 2 のようになり、予測 1 が分析値とよい一致をみた。しかし、Hb Yamagata の分析値 (**Table 4**) からは Lys → Asn の置換は認められるものの β 132または β 144の置換位置の確認は困難であった。これは Hb Mito にみられる CPase-A の反応性の

Table 4. Amino acid ratio of the analytic and estimated of values β -Yamagata globin, when hydrolyzed by CPase-A

| C-末端 アミノ酸(数) a) | CPA 1 時間反応 | | | | CPA 4 時間反応 | | | |
|--------------------|------------|-------|---------|---------|------------|------|------|------|
| | 正常 b) | 異常 c) | 予測 1 d) | 予測 2 e) | 正常 | 異常 | 予測 1 | 予測 2 |
| His (2) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Tyr (2) | 1.9 | 1.8 | 1.3 | 1.2 | 2.0 | 1.8 | 1.9 | 1.9 |
| Lys (1) | 1.1 | ★0.7 | 1.0 | ☆0.2 | 2.0 | ★1.1 | 1.0 | ☆0.9 |
| Ala (6) | 3.2 | 2.9 | 3.6 | 3.9 | 5.5 | 5.3 | 5.8 | 5.9 |
| Leu (1) | 0.7 | 0.7 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Asn (2) | 0.6 | ★0.9 | 1.1 | ☆2.0 | 0.9 | ★2.0 | 1.9 | 2.0 |
| Val (3) | 1.3 | 1.3 | 1.5 | 1.8 | 2.6 | 2.4 | 2.9 | 2.9 |
| Gly (1) | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | 1.0 | 0.9 | 1.0 | 1.0 |
| Gln (2) | 0.9 | 0.5 | 0.5 | 0.4 | 1.9 | 1.0 | 1.9 | 1.9 |

S=70.6 nmol/ml, S : E=74.7 : 1, Enzyme reacted with substrate at pH 8.5, 37 °C

a) Structural numbers of the amino acids in the C-terminal region of β -Yamagata globin

b) Amino acid ratio of the analytic values of normal β^A -globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

c) Amino acid ratio of the analytic values of β -Mito globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

d) The amino acid ratio 1 of the estimated values of β 132Lys→Asn substituted globin on the basis of C-terminal amino aci (His)

e) The amino acid ratio 2 of the estimated values of β 144Lys→Asn substituted globin on the basis of C-terminal amino acid (His)

★: The amino acid ratio of the analytic values of β -Yamagata globin differed from that of normal β^A -globin

☆: The amino acid ratio 2 of the estimated values of β 144Lys→Asn substituted globin, differed from that of analytic values of β -Yamagata globin

乏しい酸性アミノ酸への置換 (Lys → Glu) とは異なり, Lys と同じ程度の反応性の Asn への置換によるものと思われる.

考 察

ペプチドのアミノ酸配列決定は N-末端のアミノ酸から順次遊離させたアミノ酸を同定していく方法がとられているが, CPase 類を使った C-末端からの解析方法にはいろいろな難点があり, その実用化は困難なように思われてきた. しかし, 最近 CPase 類も高純度のものが市販され, C-末端アミノ酸からの分析に応用してみることは有益と思われる. またコンピュータと関連させることにより, 複雑な反応過程をも想定した解析が可能になるとと思われる. CPase 類のひとつ CPase-A のペプチド C-末端アミノ酸に対する反応性はアミノ酸の種類によって異なるとともに, C-末端第 2 位のアミノ酸にも影響される.

β^A 鎖グロビンでは C-末端から 20 個, 9 種類のアミノ酸が順次遊離されるが, それらの遊離量はアミノ酸配列に深い関係がみられ, C-末端領域にアミノ酸置換を持つ異常 Hb の一次構造決定に応用を試み, Hb Mito のアミノ酸置換 (β 144 Lys → Glu) を完全に決定することができ, また Hb Yamagata (β 132Lys → Asn) の構造をも推定することができた.

今回は CPase-A の Km に H. C. Davies の論文⁷⁾ から低基質 (Benzoxo Glycyl-L-Phe) 濃度における Km 値 (=0.81 mM) を使用したが, ここで使用したグロビン濃度はさらに低い濃度条件であった. また精製したグロビンの緩衝溶液を 37°C に加温している間にゲル化が生じ, CPase-A によるアミノ酸遊離量の変化を招くことも正常 β^A 鎖グロビンの分析結果の変動幅が広いことより認められた. 今後グロビンを可溶化させ正常 β^A 鎖グロビンの分析を行い, さらに CPase-A の反応により遊離するアミノ酸の

CPase-A 活性阻害を考慮した CPase-A 反応モデルを考え、算出した値を予測値として用いると実験値により近似したアミノ酸遊離態度の追跡が可能になると考える。

結 論

CPase-A による異常 β 鎖グロビン C-末端領域のアミノ酸配列決定は C 末端より順次遊離するアミノ酸を分析することで決定可能であった。パソコンを使用し、M-M式を組み込んだ CPase-A と β^A 鎖グロビンの反応モデルによって遊離アミノ酸量を算出するとアミノ酸分析値の解釈は

よりの確であった。コンピュータにより遊離アミノ酸の予測は置換アミノ酸の決定のみでなく置換位置の推定に役立った。CPase-A のように多種類のアミノ酸(基質)に作用し、その反応速度が基質となるアミノ酸種によって変化する場合、データ解析には反応速度理論による予測値が必要であると考え。また同方式の予測が α 鎖グロビンにも可能であり、グロビンにかぎらずある程度配列の知られているペプチド、タンパク質の一次構造の決定にも利用可能と考える。

文 献

- 1) 池中徳治：タンパク質の化学。「生化学実験講座 1」(日本生化学会編)，第 2 版。東京，東京化学同人。1976, pp. 186—211
- 2) 飛田 亨：カルボキシペプチターゼ法による蛋白質およびペプチドの C 末端構造分析。蛋・核・酵 8：83—102, 1963
- 3) Konigsberg, W. : Subtractive Edman degradation. *Methods Enzymol.* 11 : 461—469, 1967
- 4) Chang, J. Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B. : Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N, N-dimethylaminoazobenzene-4-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Lett.* 93 : 205—214, 1978
- 5) Pétra, P. H. : Bovine procarboxypeptidase and carboxypeptidase A. *Methods Enzymol.* 19 : 460—503, 1970
- 6) Smith, E. : Proteolytic enzymes. *In The Enzymes*, ed. by Summer, J. B. and Myrback, K. 1st ed. New York, Academic Press. 1951, p. 793
- 7) Davies R. C., Riordan, J. F., Auld, D. S. and Vallee, B. L. : Kinetics of carboxypeptidase A. I. Hydrolysis of carbobenzyloxycarbonyl-L-phenylalanine, benzoylglycyl-L-phenylalanine and hippuryl-*dl*- β -phenyllactic acid by metal-substituted and acetylated carboxypeptidases. *Biochemistry* 7 : 1090—1099, 1968