

λ型 Bence Jones 蛋白質의 N 末端周邊의 아미노 酸配列順序에 관한 研究

金 俊 平
大 田 大 學
(1970. 1. 31, 수리)

(N-Terminal Sequences of λ-type Bence Jones Proteins)

Jun Pyong Kim
Taejon Presbyterian College.
(Received Jan. 31, 1970)

SUMMARY

Two peptides (Im pr-M, Im ch-M) derived from Im λ-type of Bence Jones Protein and one peptide (Ikch-M) from Ik were separated and purified using the Dowex 50×2 column (1×20 cm) and Dowex 1×2(0.9×50 cm). The buffer solution was composed of 1% pyridine and 1M formic acid in Dowex 1×2 column. The blocked N-terminal was examined with ninhydrin reaction before and after alkaline hydrolysis, which was fractionated by Dowex 1×2 column.

Pyro-glutamic acid in N-terminal residue was identified by comparing with the authentic pyro-glutamic acid through a high voltage electrophoresis (pH 3.5, 3000 V.) after the peptide Im pr-M (PCA. Ser) was cleaved at the position of serine with conc. (12 N) HCl and the pyro-glutamic acid was converted to glutamic acid by treating it with N-NaOH for 116 hours at 27°C.

The subtractive method was applied to find out the sequence of peptides and carboxypeptidase A was employed to release C-terminal residue from the peptide.

In present study PCA. Ser in Im Pr-M was isolated from the pronase digested λ-type Bence Jones protein.

The yield of the Im Pr-M was 79.6 percent of its theoretical value, based on the molecular weight of Bence Jones Protein.

Im ch-M (PCA. Ser Val. Leu) was isolated from the chymotrypsin digested λ-type Bence Jones Protein. The yield of the Im ch-M was 72.2 percent. based on the molecular weight of Bence Jones Protein.

Ik ch-M (PCA. Ser. Ala. Leu) was isolated from the chymotrypsin digested λ-type Bence Jones Protein and its yield was 42% based on the molecular weight of Bence Jones Protein.

緒 論

Bence Jones 蛋白質은 抗原性에 의하여 K 型和 λ 型으로 大別되고 있는데 이들 蛋白質의 化學構造에 관하여서는 K 型에 대한 Putman^(1,2), Titani⁽³⁾, Craig⁽⁴⁾ 등의 研究와 λ 型에 대한 Titani⁽⁵⁾와 milst-

ein⁽⁶⁾의 研究가 있다. 그중 Titani는 一種의 Bence Jones⁽⁵⁾ 蛋白質의 一次構造에 대하여 研究가 있으나 骨髓腫(Myeloma) 환자의 排泄한 이들 Bence Jones 蛋白質은 환자마다 그 一次構造에 差異가 있고 아직도 未解決의 部分이 많이 남아 있다. 특히 N 末端 및 그의 周邊의 아미노酸 配列에 대하

여서는 確然한 決定이 내려지지 않고 있다. 筆者는 二種의 λ 型蛋白質(Im, Ik)의 末端을 살피기 위하여 λ 型 Bence Jones 蛋白質을 分離精製하고 이어서 그 N-末端의 組成을 DNP 法으로 究明하려 하였던바 이 方法으로는 解明할수가 없었다. λ 型 Bence Jones 蛋白質의 N 末端이 Pyrrolid-2-one-5, Carboxylic acid(PCA)의 一種이 아닌가 하여 이를 確認하는 實驗을 試圖하였다. 한편으로 適切한 蛋白質加水分解 酵素인 Pronase 와 Chymotrypsin 을 使用하여 얻은 peptide 를 선택적(Serine 의 NH_2 基부분을) 切斷하는 化學의 方法을 適用하였고 alkali 法으로 PCA 를 開環하였다. 다음에 Edman 의 PTC(Phenyl iso thio cyanate)法 및 消去法으로 그 peptide 의 아미노酸 配列順序를 定하였으며 끝으로 Carboxypeptidase A 로 C 末端을 決定하였다. 上記와 같이 λ 型 Bence Jones 蛋白質의 N 末端이 Pyrro-glutamic acid (PCA)임을 同定하였고 N 末端周邊의 아미노酸 配列順序를 決定하였기로서 이에 發表하는 바이다.

材料 및 實驗方法

1) 試料調製

λ 型 Bence Jones 蛋白質의 試料인 Im(F-1) 및 Ik(F-1)는 粗 Bence Jones 蛋白質로부터 Putman⁽¹²⁾의 方法을 筆者가 改良하여 DEAE-Sephadex A-50 Column 에 0.02 M 磷酸 Buffer (pH 8.0)와 Gradient 에 0.5 M NaCl 를 써서 얻은것으로 粗 Bence Jones 蛋白質 각각 500 mg 으로부터 Im(F-1)는 242 mg, Ik(F-1)는 146 mg. 를 얻었던 것이다.

2) Pronase 分解

Pronase 分解는 Titani⁽⁷⁾의 方法을 약간 改良하여 하였다. 즉 Bence Jones 蛋白質 Im(F-1) 100 mg 를 1% 重碳酸암모늄 (pH 7.9) 5 ml.에 녹히여 이에 pronase 를 基質에 對하여 2%가 되는 2 mg 를 加하고 室溫에서 5時間 分解시킨 후 冷凍乾燥하였다. 이것의 分解程度를 살피기 위하여 pH 3.5 에서 3000 volt 高壓濾紙電氣泳動으로 90分間 처리하였다.

3) Chymotrypsin 分解^(8,9)

50 mg 의 試料 Im(F-1)과 100 mg 의 Ik(F-1)를 각각 5 ml.의 1% 重碳酸암모늄(pH 7.9)에 녹히여기에 蛋白質의 50分의 1인 1 mg 와 2 mg 의 2回 再結合시킨 Chymotrypsin 을 넣어 室溫에서 Im 의 경우는 14時間 Ik 의 경우는 16時間 각각 分解시켰다. 分解程度를 살피기 위하여 그의 一部를 3000

volt 高壓濾紙電氣泳(pH 3.5)으로 90分 처리하여 확인후 冷凍乾燥시켰다.

4) Block 된 酸性 peptide 의 分離

試料 Im(F-1) 100 mg 를 pronase 로 分解한 후 冷凍乾燥시킨것을 脫이온水 2 ml.에 녹여 4°C 하에서 Dowex 50×2 Column(1×20 cm H⁺form) 위로 부터 서서히 넣고 脫이온水로 씻고, 流出液은 automatic fraction collector 로 각 試驗管에 4 ml 되도록 받았다. 이중 0.2 ml 를 取해 alkali 加水分解 후의 Ninhydrin 反應을 570 m μ 의 O.D.에서 測定하였다.

위의 Chymotrypsin 으로 分解한 Im(F-1)와 Ik(F-1)의 시료를 冷凍乾燥한것을 역시 少量의 脫이온水에 녹여서 Dowex 50×2(1×20 cm) Column 위에 apply 하고 각각 脫이온水로 씻어 4 ml 씩 fraction collector 試驗管에 모아 그들의 0.2 ml 를 取하여 重要部分을 찾기 위하여 alkali 分解후 Fig. 2 에 나타난것과 같이 fraction tube 번호 2~8 를 각각 한데 모으고 위에서 모은것을 少量의 1% Pyridin 溶液에 녹여 Dowex 1×2 column(0.9×50 cm acetate form)에 apply 하였다. column 은 1% pyridin 용액으로 처음 씻고 다음 gradient 는 混合槽의 한쪽에 150 ml.의 1% Pyridin 과 다른 한쪽에 1 mole 의 formic acid 150 ml.를 넣은 Buffer 로 씻어내면서 流出液이 각각 2~2.5 ml 되도록 automatic fraction collector 에 받았다.

여기에 있어서 각 fraction 은 alkali 分解前과 後의 ninhydrin 反應을 보아 block 된 酸性 N-末端 peptide 를 얻었다.

5) Alkali 加水分解⁽¹⁰⁾

0.2 ml 의 試料에 1 ml.의 2.5 N NaOH 를 加하여 100~105°C 의 oven 속에 2~4時間 넣은후 4N-Acetate Buffer(pH 5.13) 0.5 ml 를 加하여 30% 醋酸 1 ml.로 pH 5.0 로 하였다. 여기에 ninhydrin 試藥(ninhydrin 1.25 g 를 methyl cellosolve 150 ml.에 녹히고 0.01 N KCN 2.5 ml 를 加하였다)를 加하여 100°C 의 水浴속에서 15分間 끓인후 流水로 식히고 50% Ethanol 5 ml 로 희석하여 570 m μ 의 O.D. 로 測定하였다.

6) 아미노酸組成分析

別報⁽¹¹⁾實驗에서 λ 型 Bence Jones 蛋白質의 全體 組成이 200餘種의 아미노酸으로 되어있음을 알 수 있었으나 本實驗에서 N 末端의 peptide 를 얻기 위하여 Dowe×50 및 Dowex 1 로 分離한 이들 peptide 에 6 N-HCl 를 少量 加해 眞空封管하여 105°C 의

oven 속에서 20時間 加水分解시킨후 自動아미노酸 分析機에 걸어 標準아미노酸과 比較하여 peptide 의 아미노酸 組成을 결정하였다.

7) peptide 의 同定

(ㄱ) Serine 의 化學的 切斷法⁽¹²⁾

一定量の peptide 에 濃鹽酸(12 N)을 加해 15時間 27°C 室에서 증발을 막기 위하여 유리관 속에 넣고 봉하였다. 15時間反應후 脫이은水 0.1 ml 加한후 乾燥器속에서 蒸發시켜 試料로 하였다.

(ㄴ) pyrro-glutamic acid 確認法^(13,14,15)

dipeptide 로 推定된 peptide 를 濃鹽酸처리후 그 의 混合物의 一部를 取해 標準아미노酸과 合成品인 pyrro-glutamic acid 와 같이 高壓濾紙電氣泳動으로 그 의 mobility 를 調査해 보았다. 남은 試料도 高壓濾紙電氣泳動(pH 3.5, 3000 V 30分)으로 pyrro-glutamic acid(PCA)와 中性아미노酸(serine) 위치에 Fig. 1에서 본것같이 分離되므로 이를 抽出하여 冷凍乾燥시켰다. 이것에 6 N-HCl 을 加해 105°C 에서 20時間 分解시켜 그들의 아미노酸組成을 살펴보았다. 分離된 PCA 의 一部를 27°C 의 室에서 N-NaOH 로 116時間 加水分解하여 pyrro-glutamic acid 를 glutamic acid 로 전환시켰다. 이를 自動아미노酸分析機에 넣기 前에 Buffer 의 pH 2.2 에 맞도록 HCl 로 調整하였다.

(ㄷ) C-末端의 確認法^(16,17)

Tetrapeptide 의 C 末端을 確認하기 위하여 Carboxypeptidase A 를 基質에 對해 1/20 의 比로 pH 8.0 에서 ImCh-M 는 5分間, Ik Ch-M 는 15分間 反應시켜 冷凍乾燥하여 自動아미노酸 分析機에 넣어 그 遊離된 아미노酸을 살펴 보았다.

(ㄹ) Edman 의 改良된 PTC 法 및 消去法

Tetrapeptide 의 濃鹽酸處理後 分離된 Tripeptide 의 N-末端配列을 살펴기 위하여 Ik Ch-MG 및 Im Ch-MG 를 다음 diagram 와 같은 Edman 의 改良된 PTC 法^(18,19) 및 消去法(subtractive method)^(20,21) 으로 확인하였다.

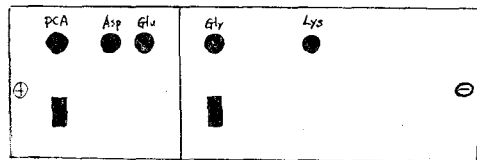


Fig. 1. The pattern of high volt paper electrophoresis (3000 V, pH 3.5, 30 min.) dipeptide treated 15 h. with conc. HCl at 27°C

The procedure of modified Edman degradation method.

Peptide in brown tube → dried → *1 DMAA Buff. pH 9.5 0.5 ml. (or pH 9.0 *2 N-Ethyl Morpholine) (0.5 ml. conc. pyridine 0.5 ml.)
 → *3 PTC 5 λ → 2 hrs. 37°C → Benzene wash × 3
 Cyclohexane wash × 1
 → water layer → dried → *4 TFA 0.5 ml cyclize 30 min. 37°C → TFA dried in vacum dissolve H₂O
 0.5 ml. extract 0.5 ml × 3 Ethyl Acetate

→ [Extracted with Ac OEt, dried (Identify with D.E. Solvent⁽²²⁾)]
 → Aq. layer dried (A portion use for AAA, other for 2nd step of PTC)

*1 DMAA (Dimethyl Allyl Amine) Buffer

15 ml. Pyridine (distilled)

10 ml Dist. H₂O

1.18 ml DMAA

Adjust pH 9.5 with Trifluoro Acetic Acid

*2 5% NEM (pH 10~11) adjust pH 9.0 with N-Acetic Acid.

*3 PTC=Phenyl iso thio cyanate

*4 TFA=Trifluoro acetic acid

結果 및 考察

1) Block 된 酸性 peptide 의 分離

試料 Im(F-1) 100 mg 를 實驗方法에서 기술한바 와 같이 pronase 分解후 Dowex 50 × 2 column (1 × 20 cm H⁺-form)를 通한것을 alkali 分解하여 570 mμ O.D.에서 測定한 結果는 Fig. 2 와 같았으며 fraction tube 번호 2~8 의 것을 모아 冷凍乾燥하니 約 10 mg 되었다.

Im(F-1), Ik(F-1)의 chymotrypsin 分解物을 Dowex 50 × 2 column 을 通한것의 試驗結果도 Fig. 2 와 같았다.

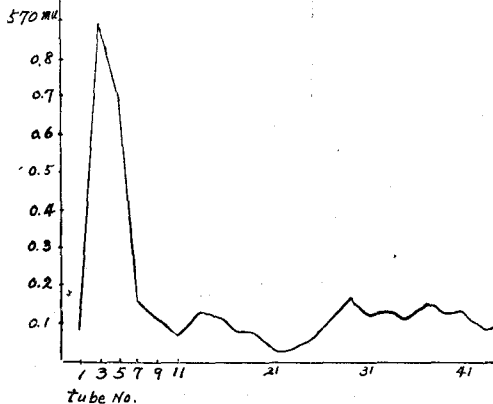


Fig. 2. Ninhydrin reaction after Alkaline hydrolysed Im F-1 chromatographic fractionation Dowex 50 × 2(H⁺-form) column (1 × 20cm) (570 mμ)

Im 및 Ik의 pronase 및 chymotrypsin 分解物을 Dowex 50×2 column 을 통하여 分離하고 다시 Dowex 1×2 (acetate form) column 을 통한것의 chromatogram 은 다음 Fig. 3, 4, 5 에 表示한것과

같다.

Fig. 3의 Pr-M, Fig. 4의 Ch-M, Fig. 5의 Ch-M 은 다같이 alkali 分解前에는 ninhydrin 反應이 negative 였으나 alkali 分解後는 positive 였다

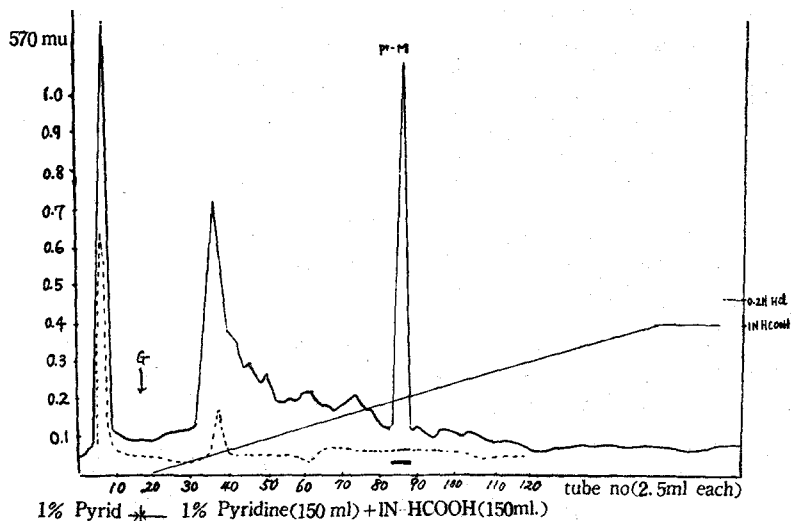


Fig. 3. Chromatographic fractionation of Im-F-1 pronase digested, on Dowex 1×2 (acetate-form) column (0.9×50cm)
Solid line=After Alkali hydrolysis
Broken line=Before Alkali hydrolysis

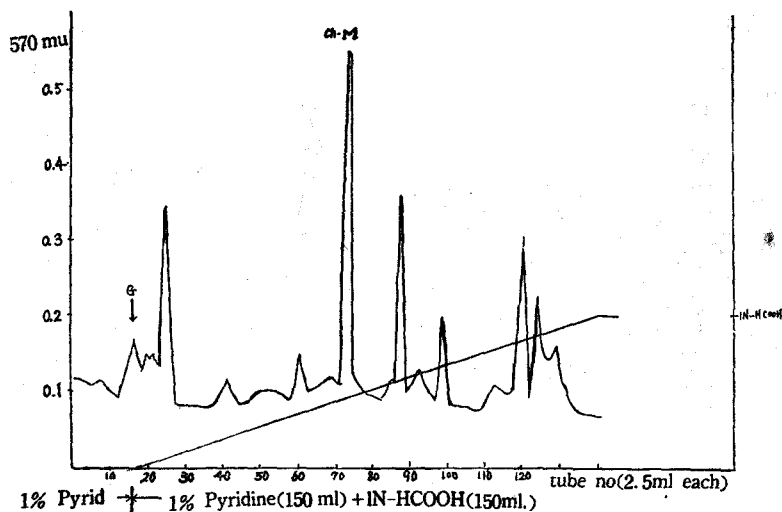


Fig. 4. Chromatographic fractionation of Im F-1 chymotrypsin digested, on Dowex 1×2 (acetate-form) column. Ninhydrin color-values after alkali hydrolysis.

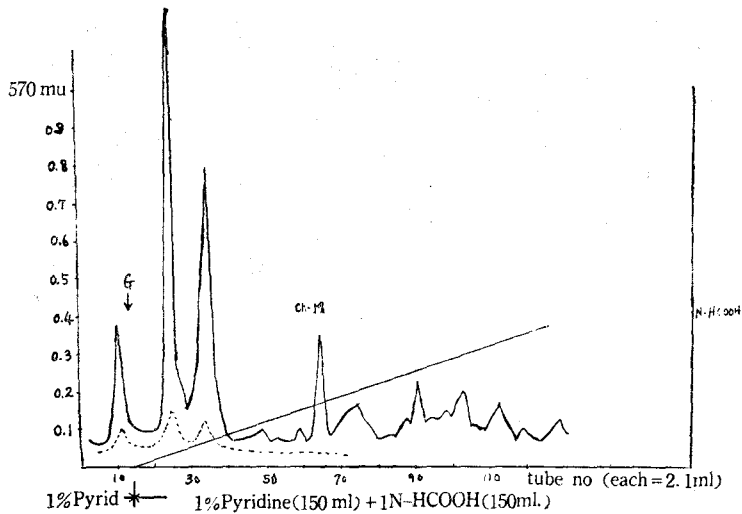


Fig. 5. Chromatographic fractionation of Ik F-1 chymotrypsin digested. on Dowex 1×2 (acetate-form) column (0.9×50 cm)
Before Alkali Hydrolysis
 —After Alkali Hydrolysis

위와 같은 방법으로 얻는 각 peptide의 구성을 자동아미노산분석기로 살펴 보았더니 Table I에 표시한 바와 같이 Im Pr-M는 dipeptide, Im Ch-M, IkCh-M는 Tetrapeptide로 구성된 peptide로 추

정되었다. 그收量은 Bence Jones蛋白質의 분자량^(23,24)에 의하여 計算하여 보았더니 Im Pr-M는 79.6%, Im Ch-M는 72.2% 그리고 IkCh-M는 42%였다.

Table 1. Amino acid composition of peptide Im Pr-M, ImCh-M and IkCh-M

Amino Acid	Glu	Ser	Val	Ala	Leu	Yield
Peptide	mole	mole	mole	mole	mole	%
Im Pr-M	1.0	(1.0)				79.6
Im Ch-M	1.35	(1.0)	0.7		0.7	72.2
Ik Ch-M	1.1	0.97		(1.0)	0.97	42

Parenthesized Amino Acid is Standardized.

이상의 결과와 같이 200개 이상이 아미노산으로 된蛋白質을 pronase를 사용하여 chymotrypsin보다 더 작은 peptide로 나눌수 있었으며 이들 peptide의 N-末端이 DNP法으로 檢出되지 않으므로 切斷된 많은 peptide中에서 N-末端의 것은 Narita의 方法^(25,26)에 準하여 (mosaic virus 研究에서 acetylation된 N-末端을 分離하는데 使用하였던) Dowex 50×2 column으로 처리하여 酸性 peptide만 流出시키고 다른 peptide는 全部 吸着시켰다. 流出된 酸性 peptide는 다시 Dowex 1×2 column으로 다른이 들이 별로 쓰지 아니한 Buffer인 N-HCOOH를 1% pyridine Buffer와 gradient에 使用하여 alkali分解의 前과 後의 性質을 利用함으로써 pyrro

화된 peptide를 좋은 收量으로 얻었고 이 serine를 포함한 peptide를 濃鹽酸으로 나눌 수 있었다. Block된 N-末端은 authentic pyrro-glutamic acid와 高壓濾紙電氣泳動으로 確認할 수 있었으며 cycle화된 것을 開環하는데 筆者는 N-NaOH로 長時間(116시간) 反應시켜 pyrro-glutamic acid로부터 glutamic acid로 60% 이상 전환시킬 수 있었다.

2) peptide의 아미노酸 配列 同定

Table I에 表한바와 같이 Impr-M가 dipeptide로 推定되며 이 peptide中에 serine이 포함되어 있으므로 이 位置를 濃鹽酸을 使用하는 切斷法에 依하여 두 부분으로 나눌수 있었다. 即 Fig. I에서와 같이 PCA와 中性아미노酸 位置에 나타난 serine

으로分離되었으며 이 peptide의 N-末端檢出은別報⁽¹¹⁾實驗結果로 알 수 있는 것과 같이檢出되지 아니한 것으로 미루어 보아 glutamic acid가 pyrroglutamic acid인環狀으로된 것으로 보았다. 電氣泳動(高壓濾紙)結果 얻은 PCA를 N-NaOH로 27°C에서 116時間加水分解하여 pyrro-glutamic acid가 glutamic acid로 전환된것은抽出한 PCA의 6N-HCl加水分解와比較하여 62%가 전환되었음을 알 수 있었다.

Im Ch-M와 Ik Ch-M의推定Tetrapeptide는 Table I에서 보는바와 같이 4개의 아미노酸中 valine과 alanine이 서로 다른것을 알 수 있었다. 이들 Tetrapeptide도濃鹽酸처리하여高壓濾紙電氣泳動으로分離한것은 Fig. 6에서 보는바와 같이中性아미노酸 위치에 N과 G의 두점이 있었다. paper chromatography를 사용하여 G점의 것이 tripeptide로推測되었으며 N점의 것은 불순물인것을 알았다. 각 PCA 및 G점의 것은脫이온수로抽出(Ik=40%, Im=44%抽出되었다)하며 PCA

의一部를 6N-HCl로 20時間加水分解하여自動아미노酸分析機에 넣어 glutamic acid가 나타난것을 알 수 있었다. 또한 이를 N-NaOH로 120時間 27°C에서 처리하여 PCA가 glutamic acid로 76%(Ik Ch-M) 전환됨을 알 수 있었다.

G점의 것을自動아미노酸分析機로分析한結果는 다음 Table 2와 같다.

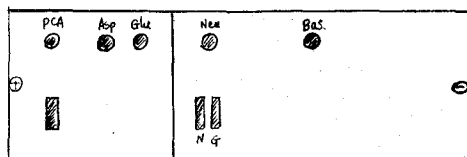


Fig. 6. The pattern of paper electrophoresis (3,000V, pH 3.5 30 min) Tetrapeptides treated with Conc. HCl.

각 Tetrapeptide Im Ch-M 및 Ik Ch-M의 C末端을 Carboxypeptidase A로 살펴보았더니 Table 3과 같았다.

Table 2. Amino acid composition of Tripeptides. Im-Ch-M.G. and Ik Ch-M.G. after 70 hrs. 6N-HCl Hydrolysis, (Molar ratio is expressed in Parenthesis)

Peptide	Amino acid	Ser	Val	Ala	Leu
		μ mole	μ mole		μ mole
Im Ch-MG		0.03 (0.7)	0.044(1)		0.044(1)
Ik Ch-MG		0.045(0.95)		0.046(1)	0.047(1)

Table 3. The released amino acids with Cpase A on Peptides. 5 min. with Im-Ch-M and 15 min. with IkCh-M, (mol/mol Peptide)

Peptide	Amino acid	Leu	Ala	Val
Im Ch-M		0.5 mole		0.5 mole
Ik Ch-M		0.6 mole	0.15 mole	

Cpase A.....Carboxypeptidase A

Tripeptide인 Im Ch-MG 및 Ik Ch-MG를앞에 서言及한바와 같은 Edman의 degradation 및消去法으로 N-末端으로부터 하나씩 아미노酸을消去시킨 후 남아있는 peptide의 아미노酸配列順序를 살핀結果는 Table 4와 같다. 即 Im Ch-MG의 아미노酸配列順序는 Ser. Val. Leu.이며 Ik Ch-MG는 Ser. Ala. Leu.임을 알 수 있었고 Im Ch-M의 아미노酸配列은 PCA, Ser, Val, Leu. Ik Ch-M의 아미노酸配列은 PCA, Ser, Ala, Leu임을 알 수 있었다.

Table 4. Result of AAA in Substrative Method

Peptide	Composition of amino acid	Result of AAA after 1st deg.	Result of AAA after 2nd deg.
		μ mole	μ mole
Im Ch-MG	Ser	0.09	Trace
	Val	0.023	0.01
	Leu	0.023	0.0014
Ik Ch-MG	Ser	0.018	0.008
	Ala	0.061	0.0015
	Leu	0.056	0.039

AAA.....Amino acid analysis.

以上の結果와 같이 Serine 位置를 切斷함에 있어 蛋白質의 一次構造研究에는 別로 쓰지 아니한 濃鹽酸으로 成功的으로 이를수 있었고 또한 N-末端이 pyrro-glutamic acid 이었다는 것을 合成品과 比較해 확인하였으며 또한 分離된 pyrro-glutamic acid 를 N-NaOH 를 써서 glutamic acid 로 전환시키는 實驗을 通하여 再確認하였던 것이다. 그리고 Edman 의 phenyl isothiocyanate (PTC) 法으로 誤認하기 쉬운 아미노酸配列實驗을 消去法과 Carboxy-peptidase A 로 C-末端으로 부터 유리시켜 확인하였다. λ型에 있어 그 末端에 PCA 가 없다는 λ型(Sh)의 Ser. Glu. Leu. Thr. 의 一例報告⁽²⁷⁾도 있으나 筆者의 二列에 있어서 다같이 PCA 이었으며 이것은 Rabbit γ-Chain^(28,29)의 PCA. Ser. Leu. Glu. 와 같은 N-末端이다.

λ型(Sh)에 있어서 그 N-末端이 Serine 으로 되어있으므로 DNP 法으로 末端周邊의 Sequence 가 쉽게 풀린 모양인데 이것은 偶然的 例라고 볼수 있고 筆者가 다른 λ型과 같이 PCA 로 末端이 막힌 경우는 筆者가 試圖한 Pronase 및 Chymotrypsin 分解法, alkali 分解法, 化學的切斷法, Edman 의 PTC 法 및 消去法등의 綜合에 의하여 解明한 수 있었다.

要 約

Bence Jones 蛋白質中 λ型的 N-末端 및 그 周邊의 아미노酸配列을 決定하기 위하여 本 實驗이 試圖되었던바 그 結果는 다음과 같다.

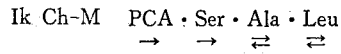
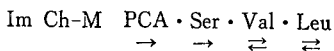
1) Bence Jones 蛋白質을 Pronase 와 Chymotrypsin 으로 分解하여 얻은 peptide 중에서 Im Pr-M 및 Im Ch-M 와 Ik Ch-M 을 Dowex 50×2 column (1×20cm)와 Dowex 1×2 column(0.9×50 cm)을 使用하여 分離하였다.

2) λ型 Bence Jones 蛋白質의 N-末端은 pyrro-glutamic acid 로 되어있음을 alkali 反應과 高壓濾紙電氣泳動法으로 確認하였다.

3) 濃鹽酸(12 N) 反應(27°C, 15 時間)을 利用하여 Peptide 中の Serine 部를 選擇的으로 切斷할 수 있었다.

4) 이들 Peptide 의 아미노配列順序는 Edman 의 PTC 法과 消去法 및 Carboxypeptidase A 를 使用하여 決定하였다.

5) 分離한 Peptide 의 아미노酸配列順序는 다음과 같았다.



參 考 文 獻

1. F.W. Putman, A. Yiyake; J. Biol. chem. 227, 1083(1957).
2. F.W. Putman, A. Yiyake; Science 120, 848 (1954).
3. M. Wikler, K. Titani, F.W. Putman; J. Biol. chem. 242, 1669(1967).
4. N. Hirschmann, L.C. Craig; Proc. Natl. Acad. Sic. 53, 1403(1965).
5. K. Titani, M. Wikler, F.W. Putman; Science 155, 828(1967).
6. C. Milstein; Nature 209, 370(1966).
7. Koiti, Titani, Kozo Narita; Journal of Biochemistry 51, 350(1962).
8. Lab. Experiment in protein(Tokyo) 4, 41(1965)
9. Techniques in protein chemistry (London) 147, (1967).
10. Lab. Experiment in Protein (Tokyo) 4, 98 (1965).
11. J.P. Kim; Journal of Korean Agr. chem. Society 13, 59(1970).
12. G.M. Bernier, F.W. Putman; Biochem, Biophys. Acta, 86, 295(1964).
13. T. Ikenaka, J. Biol. Chem. 241, 5560(1966).
14. Blomback. B., Doolittle, R.F.; Acta chem. Scand., 17, 1861(1963).
15. Decker, C.A. Stone D. Fruton J.S., J. Biol chem. 181, 719(1949).
16. J. Lens; Biochem. Biophys. Acta. 3, 367(1947)
17. Techniques in Protein chemistry (London) 222(1967).
18. P. Edman; Arch Biochem. 22, 475(1949).
19. P. Edman; Acta. chem, Scand, 4, 283(1950).
20. Techniques in protein chemistry (London) 203 (1967).
21. Protein. Nucleic acid, Enzyme. (Tokyo) 8, 44(1963).
22. Protein. Nucleic acid. Enzyme. (Tokyo) 8, 12(1963).
23. F.W. Putman, K. Titani, M. Wikler, T. Shinoda; Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology vol X X X II, 9(1967).
24. Hill. R.L., R. Delaney. R.E. Fellows. H.E.

- Levit; proc. Natl. Acad, Sci 56, 1762(1966). 31, 372(1959).
25. Kozo. Narita; Biochimica ET Biophysica Acta. 27. K. Titani; Journal of Clinical Science; 3, 1238
30, 352(1958). (1967).
26. Kozo Narita; Biochimica ET Biophysica Acta;