

## マサバ筋原線維の加熱変性に対する直鎖オリゴ糖 および還元直鎖オリゴ糖の抑制作用<sup>\*1</sup>

三浦 靖, 西村 彰夫, 高柳 敏 紀

(1991年5月24日受付)

### Protective Effect of Linear Oligosaccharides and Hydrogenated Linear Oligosaccharides on the Thermal Denaturation of Chub Mackerel Myofibrils<sup>\*1</sup>

Makoto Miura,<sup>\*2</sup> Akio Nishimura,<sup>\*2</sup> and Toshinori Takayanagi<sup>\*3</sup>

The protective effects of linear oligosaccharides and hydrogenated linear oligosaccharides on thermal denaturation of chub mackerel myofibrillar proteins at 35°C and at pH 7.5 were studied by measuring the apparent rate constant of inactivation of their Ca-ATPase.

It was found that the protective effects of linear oligosaccharides ( $DE_{45}$ ,  $\overline{DP}_n$  2.7) and hydrogenated linear oligosaccharides ( $\overline{DP}_n$  2.7) were similar to those of sucrose and D-sorbitol. It was also suggested that the mean number of equatorial hydroxy groups, the mean degree of polymerization, and the distribution of degree of polymerization in the oligosaccharide molecules were important factors for evaluation of the protective effect against thermal denaturation of the myofibrillar proteins.

グリセロールやソルビトールなどの直鎖ポリオールやスクロースなどの糖などのいわゆるポリオールの添加により、タンパク質の変性や酵素の失活が抑制されることが、経験的に古くから知られており、生化学や食品加工および食品保蔵の分野で広範に応用されてきている。魚肉タンパク質については、スケトウダラ冷凍すり身の製造の際にスクロースおよび/またはソルビトールを添加してタンパク質の冷凍変性を抑制しているのがその代表的な例である。

月向らは、グリセロールなどの直鎖ポリオール、イノシトールなどの環状ポリオール、およびグルコースなどの糖の水溶液中におけるキモトリプシノーゲンやリゾチーム、コラーゲン、リボヌクレアーゼ A などのタンパク質と溶媒成分との相互作用の熱力学的解析を行い、ポリオールによるタンパク質の加熱変性抑制機構の解明を行っている。<sup>1)-5)</sup> その結果、ポリオールの有するタンパク質の加熱変性抑制効果は、これらの水溶液中でタンパク質が選択的水和を起こすことによりタンパク質の化学ポテンシャルを増加させてタンパク質を安定化させることであると述べている。さらに、糖については equatorial

位の OH 基 (以下、e-OH と略す) が多いほど、直鎖ポリオールについては鎖長が長いほど、つまり OH 基数が多いほど変性抑制効果が大きいことを明らかにしている。

一方、魚肉タンパク質については、筋原線維タンパク質の加熱変性に及ぼす糖、直鎖ポリオールおよび糖アルコール、<sup>6)</sup> カルボン酸およびアミノ酸、<sup>7)</sup> 魚肉の水抽出成分<sup>8)</sup> の影響について一連の研究がなされているが、添加したこれら溶質の構造と水分子の配列およびタンパク質分子の水和との関連性ならびに合理的で普遍性のあるタンパク質変性抑制機構の解明までには至っていない。

本研究は、これまでの研究が少ないデンプン加水分解物、すなわち  $\alpha$ -1,4-グルコオリゴ糖 (マルトデキストリン) の混合物である直鎖オリゴ糖や、その還元物である還元直鎖オリゴ糖の冷凍すり身への利用を目的としている。魚類の筋原線維タンパク質の冷凍変性に及ぼすポリオールの作用が加熱変性に対する場合と類似していることが知られている<sup>9)</sup> ので、本報では、他の糖や糖アルコールの効果と効率的に比較しながら、魚肉タンパク質の分散系における加熱変性に対する直鎖オリゴ糖および選

<sup>\*1</sup> 冷凍すり身へのオリゴ糖の利用に関する研究—I。

<sup>\*2</sup> 三菱化成(株)総合研究所 (Research Center, Mitsubishi Kasei Co., Kamoshida, Midori, Yokohama, Kanagawa 227, Japan).

<sup>\*3</sup> 三菱化成食品(株) (Mitsubishi-Kasei Foods Co., Ichikawa BLDG., Ginza, Chuo, Tokyo 104, Japan).

元直鎖オリゴ糖の影響を検討した。

### 実験方法

**試薬** 糖として直鎖オリゴ糖 (商品名「オリゴトース」, 三菱化成食品 (株)), 直鎖ポリオールとして D-ソルビトール (特級, キンダ化学 (株)), meso-エリスリトール (Merck 社), 糖アルコールとして還元直鎖オリゴ糖 (商品名「オリゴトース H-70」, 三菱化成食品 (株)) を用いた。

なお, オリゴトースは固形分含量 72% のデンプン加水分解物 (デキストロース当量: DE45, 数平均重合度:  $\overline{DP}_n$  2.7, 数平均分子量:  $\overline{MW}_n$  450) であり, 後述する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による糖組成はグルコース 1.8%, マルトース 37.8%, マルトトリオース 44.9%, マルトテトラオースからマルトデカオースまで 12.1%, マルトウンデカオース以上 3.3% である。また, オリゴトース H-70 は「オリゴトース」の還元物で, いわゆる還元デンプン加水分解物 ( $\overline{DP}_n$  2.7,  $\overline{MW}_n$  462) であり, その組成は, ソルビトール 2.8%, マルチトール 34.3%, マルトトリイトール 44.2%, マルトテトライトールからマルトデカイトールまで 12.8%, マルトウンデカイトール以上 5.9% である。

他の試薬は, 特級品を用いた。

なお, 本論文中では溶質の構造を明確にするために還元単糖の還元物を直鎖ポリオール (グリセロールやソルビトールなど), 還元末端が還元された糖を構成成分とする糖誘導体を糖アルコール (マルチトールやラクチトールなど), グルコースやスクロースなどを糖, 直鎖ポリオールや環状ポリオール (イノシトールなど) や糖アルコール, 糖を総称してポリオールと記載した。

**オリゴ糖の HPLC** HPLC 装置は, 液体クロマトグラフ LC-6A (島津製作所 (株)) を用いた。カラムには, ステレン・ジビニルベンゼン共重合体系の強酸性カチオン交換樹脂が充填された MCI GEL CK-04SS カラム (8.0ID×300 mm, 三菱化成 (株)) を使用し, 移動相は蒸留水, 移動相の流速 0.2 ml/分, カラム温度 65°C, 検出は示差屈折計で 20  $\mu$ l の試料を注入して HPLC を行った。

**筋原線維懸濁液の調製** 新鮮なマサバ *Chub mackerel Scomber japonicus* の背筋を細切し, グリセロールと重量比で 1:1 に混合して -25°C に保存しておいた試料から加藤らの方法<sup>10)</sup> を準じて筋原線維を調製し, 0.16 M KCl 含有 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に分散させた。

**筋原線維タンパク質の加熱変性処理** 試料懸濁液に対して一定のモル濃度になるようにポリオールを添加溶解した後, その 2 ml ずつを試験管に分注し, 35°C に調整

した恒温水槽内に保持し, 一定時間毎に取り出して水冷して加熱変性処理を停止させた。

現在の冷凍すり身製造においては, 脱水魚肉に対して 5~8% のスクロースおよび/または D-ソルビトールを添加して魚肉タンパク質の冷凍変性を抑制しているが, これはすり身の水分量に対して 0.3~0.5 M に相当している。<sup>11)</sup> 本研究では各種ポリオールを水に対して 0.5~2.0 M という広い濃度範囲で添加した。

**Ca-ATPase 活性の測定** 筋原線維の Ca-ATPase 活性は, 0.1 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-Maleate 緩衝液 (pH 7.0) および 1 mM ATP の組成液で, 25°C において反応させて遊離する無機リン酸を Gomori 法<sup>12)</sup> の変法<sup>13)</sup> によって比色定量し, 比活性 ( $\mu$ mol·P<sub>i</sub>/min·mg タンパク質) を求めた。なお, ポリオールが共存すると Ca-ATPase 活性が見かけ上阻害されるので, 実験中におけるタンパク質の変性を回避するために透析を行わずに, 対照試料にも同濃度のポリオールを添加して Ca-ATPase 活性を測定し, ポリオールの影響を相殺した。

**Ca-ATPase 活性の失活速度定数の算出** ポリオールの共存とは関係なく, Ca-ATPase の失活を一次反応式に従って解析し, 見かけの変性速度定数 ( $K_D$ ) ならびに変性抑制効果値 (E 値) を大泉らの方法<sup>6)</sup> に従って算出した。なお, 解析には未加熱試料の Ca-ATPase 活性に対する相対活性を用いた。また, 溶質のモル濃度基準での変性抑制効果値に加えて重量パーセント濃度基準での変性抑制効果値 (便宜上, E' と記載する) を E 値の場合と同様な手順で求めた。

**タンパク質濃度の定量** 標準として牛血清アルブミン画分 V を用いてビウレット法<sup>14)</sup> で比色定量した。

### 結果および考察

**Ca-ATPase 活性の加熱失活に及ぼすポリオールの影響** マサバ筋原線維懸濁液に濃度 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 M になるように直鎖オリゴ糖である「オリゴトース」, meso-エリスリトール, D-ソルビトール, 還元直鎖オリゴ糖である「オリゴトース H-70」をそれぞれ添加して 35°C の加熱処理による Ca-ATPase 活性の失活を経時的に測定した。Fig. 1 にこれらのポリオールを 1.0 M 添加した場合の相対活性を示した。この濃度以外のすべての添加濃度でも Ca-ATPase 活性の失活は, 一次反応に従って進行した。

次に, 添加したポリオールの濃度に対して見かけの変性速度定数  $K_D$  をプロットしたのが Fig. 2 である。meso-エリスリトール, および D-ソルビトール添加系は 2.0 M 付近まで, 直鎖オリゴ糖と還元直鎖オリゴ糖は 1.0 M 付近まで検討したが, ポリオールのモル濃度と  $K_D$  との間

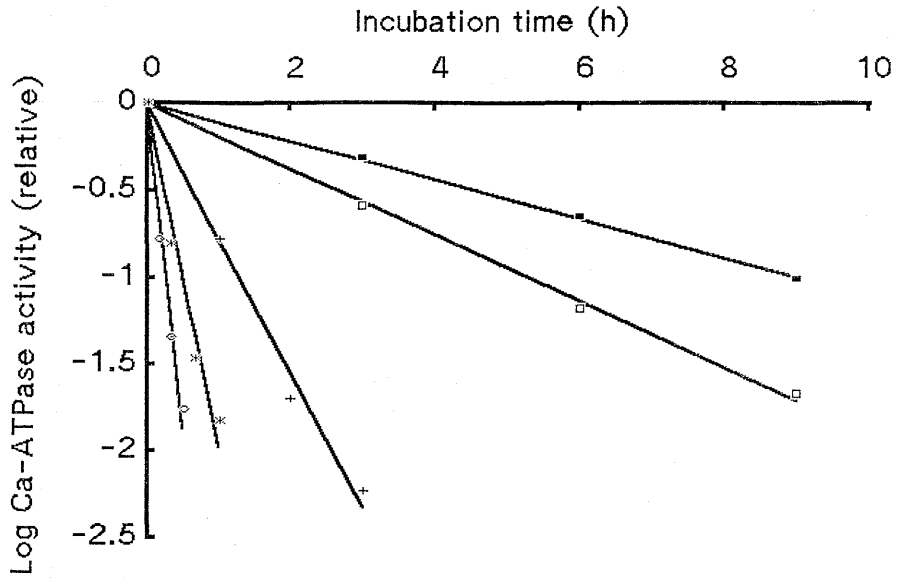


Fig. 1. Effect of linear oligosaccharides and hydrogenated linear oligosaccharides on Ca-ATPase activity of chub mackerel myofibrils on heating at 35°C.

○, control; \*, 1.0 M *meso*-erythritol; +, 1.0 M D-sorbitol; □, 1.0 M linear oligosaccharides; ■, 1.0 M hydrogenated linear oligosaccharides.

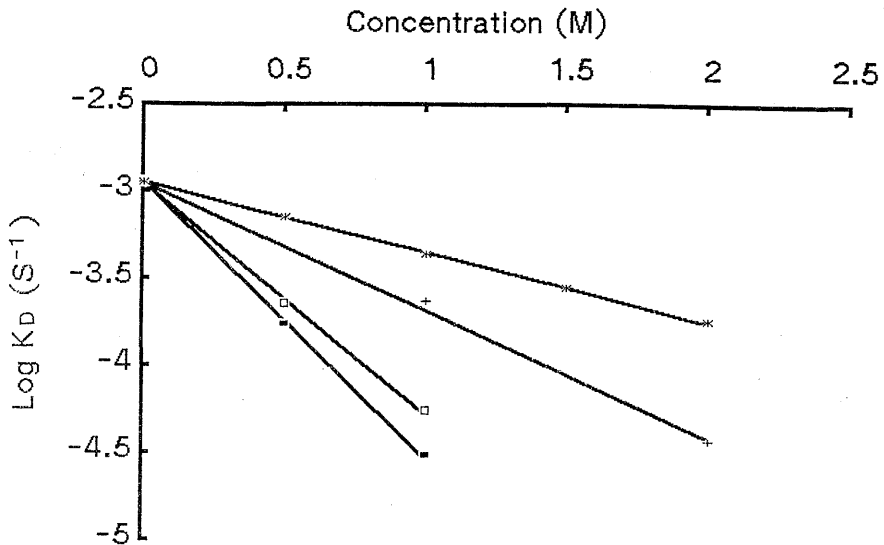


Fig. 2. The apparent rate constant for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase as a function of concentration of linear oligosaccharides and hydrogenated linear oligosaccharides.

■, hydrogenated linear oligosaccharides; □, linear oligosaccharides; +, D-sorbitol; \*, *meso*-erythritol.

に直線性が認められた。

ポリオールが有する筋原線維タンパク質の加熱変性抑制効果 Fig. 2 に示した結果から、マサバ筋原線維タンパク質の加熱変性に対する各種ポリオールの変性抑制効果を変性抑制効果値、E (大泉らの定義<sup>9)</sup>による数値で、添加物 1 M の共存による筋原線維タンパク質の加熱変性

速度定数の減少程度を表す。この値が大きいほど変性抑制効果が大きい。)として算出し、大泉らの結果<sup>9)</sup>と共に Table 1 に示した。E 値は、還元直鎖オリゴ糖>直鎖オリゴ糖>スクロース>D-ソルビトール>*meso*-エリトリールの順に大きくなった。一方、重量パーセント濃度基準での変性抑制効果値 (E') は、D-ソルビトール>還元

直鎖オリゴ糖>meso-エリスリトール>スクロース>直鎖オリゴ糖の順に大きかった (Table 1)。以上のことから今回用いた直鎖オリゴ糖と還元直鎖オリゴ糖は、従来から冷凍すり身に用いられていたスクロースや D-ソルビトールとほぼ同等の加熱変性抑制効果を有していることが明らかになった。また、この直鎖オリゴ糖と還元直鎖オリゴ糖は HPLC から求めた分子量分布がほぼ等しいにもかかわらず、糖アルコールの混合物である還元直鎖オリゴ糖の方が加熱変性抑制効果が高かった。

上記のようなポリオールによるタンパク質の加熱変性抑制は、タンパク質の水和構造の摂動を通して担われることが明らかになってきている。<sup>1)-5)</sup> すなわち、水の構造化が進行するにつれてタンパク質分子の疎水性側鎖に対してはこれらの salting-out 的作用が強まり、逆にペプチド主鎖に対しては salting-in の効果が強まる。その結果としてタンパク質分子の疎水的相互作用が安定化されるので、タンパク質分子は安定化されると説明されている。

#### 糖の分子構造とタンパク質の変性抑制効果との関連

糖では e-OH が water-structure making 作用の支配的因子であるため、<sup>1b)</sup> この e-OH 基の割合の大きい糖ほど加熱変性抑制効果も大きくなることが知られている。<sup>16)</sup>

グルコースにはピラノース型の  $\alpha$  アノマーと  $\beta$  アノマーが存在するので、一分子中の e-OH 基の平均数は 4.67,<sup>4)</sup> スクロースの e-OH 基の平均数は 6.5,<sup>10)</sup> マルトースには  $\alpha$  アノマーと  $\beta$  アノマーが存在するので 7.62,<sup>4)</sup> マルトトリオースでも  $\alpha$  アノマーと  $\beta$  アノマー

Table 1. The protective effect of polyols against thermal denaturation of myofibrillar proteins

Solute	Protective effect	
	$E (M^{-1})^{*1}$	$E' \times 10^2 (9\%^{-1})^{*2}$
Glucose	0.67 <sup>*5</sup>	3.72
Maltose	0.63 <sup>*5</sup>	1.84
Sucrose	0.77 <sup>*5</sup>	2.25
Maltotriose	1.07 <sup>*5</sup>	2.12
Linear oligosaccharides <sup>*3</sup>	1.26	2.14
Glycerol	0.08 <sup>*5</sup>	0.87
meso-Erythritol	0.40	2.40
Xylitol	0.46 <sup>*5</sup>	3.03
D-Sorbitol	0.68	3.04
Lactitol	1.04 <sup>*5</sup>	3.02
Hydrogenated linear oligosaccharides <sup>*4</sup>	1.57	2.55

\*1 Protective effect against the inactivation of myofibrillar Ca-ATPase. This parameter is the slope of linear relation between  $\log K_D$  versus polyol concentration (M) as shown in Fig. 2.

\*2 Calculated on the basis of percent concentration (w/v).

\*3 Oligotose; DE 45,  $\overline{DP}_n$  2.7,  $\overline{MW}_n$  450.

\*4 Oligotose H-70;  $\overline{DP}_n$  2.7,  $\overline{MW}_n$  462.

\*5 From T. Oizumi et al.: *Nippon Suisan Gakkaishi*, 47, 901-908 (1981).

が存在するので 9.8,<sup>17)</sup> マルトテトラオースでは  $\alpha$  アノマーと  $\beta$  アノマーの存在率が不明であるが、すべて  $\alpha$  アノマーとすると 13,  $\beta$  アノマーとすると 14 というようにグルコースを単位とした重合度が高いほど、その糖分子中の e-OH 基の平均数は増加する。一方、今回用い

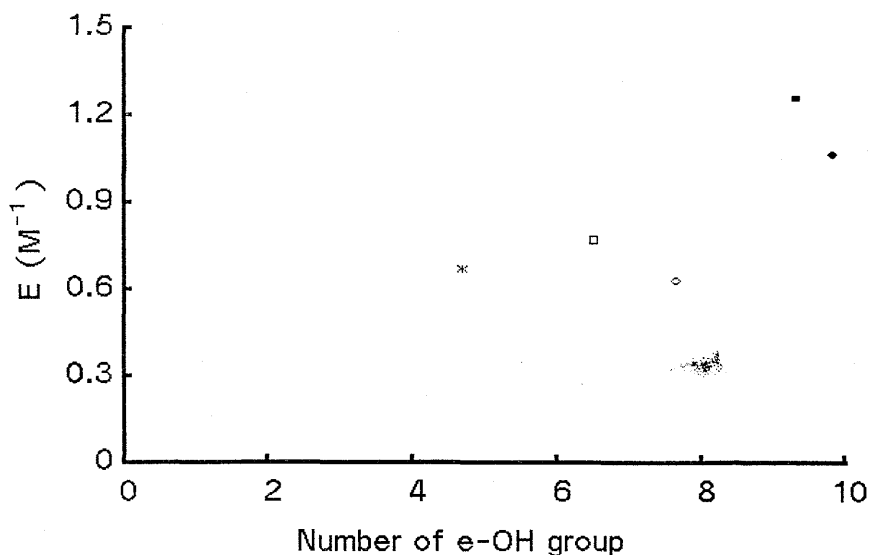


Fig. 3. Dependence of E on the mean number of equatorial OH groups per saccharide molecules.

E values are quoted from the data in Table 1.

\*, glucose; O, maltose; □, sucrose; ●, maltotriose; ■, linear oligosaccharides.

た直鎖オリゴ糖の e-OH 基の平均数は、グルコースのそれが 4.67, マルトースでは 7.62, マルトトリオースでは 9.8, マルトテトラオース以上では  $\alpha$  アノマーと  $\beta$  アノマーの存在率が不明であるが、すべて  $\alpha$  アノマーとして数平均すると 9.3, マルトテトラオース以上をすべて  $\beta$  アノマーとして数平均すると 9.8 である。我々の結果および大泉らの結果<sup>6)</sup> (Table 1) を Fig. 3 にまとめて示したが、e-OH 基の平均数 9.3 (マルトテトラオース以上がすべて  $\alpha$  アノマーの場合) ~ 9.8 (マルトテトラオース以上がすべて  $\beta$  アノマーの場合) の直鎖オリゴ糖、次いで e-OH 基の平均数 6.5 のスクロースの順に変性抑制効果が高くなっており、分子中の e-OH 基数が多い糖ほど加熱変性抑制効果も大きくなるという知見を支持した結果となった。しかし、e-OH 基の平均数 9.8 のマルトトリオースよりも e-OH 基の平均数 9.3~9.8 で、マルトトリオース含量が 44.9% である直鎖オリゴ糖の E 値の方が大きいのは、オリゴ糖の OH 基の親水性水和の協調性およびオリゴ糖分子間の水和殻相互作用、オリゴ糖分子内の隣接糖残基間の水和殻相互作用が水和殻の安定性に寄与するという知見<sup>18),19)</sup> から、直鎖オリゴ糖のようにマルトデキストリンの混合物の場合にはマルトデキストリン間の相互作用により水の構造化が相乗的に促進されるからであると推察される。この点に関しては更なる研究が必要であろう。また、無条件に e-OH 基数が多いほど water-structure making 作用は大きくなると考えられる。それは、重合度の小さいオリゴ糖の e-OH 基は水のトリジマイド型構造中に適合し水が構造化すると同時に、その糖の周囲のマイクロ粘度が増大する。すなわち束縛水 (不凍水) の量が増加するが、糖分子の大きさがある程度以上になると、逆に排除体積効果により水の構造を乱してしまうとともに、オリゴ糖や多糖類では CH 基があるコンフォメーションをとれば、疎水性領域を系に生成させてしまうことが指摘されている<sup>20)</sup> からである。また、マルトデキストリンの  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) グリコド結合の linkage rotation 値<sup>21)</sup> が重合度 4 まで大きく低下し、重合度 7 以上ではアミロースのそれと同等になり重合度 6 を境界にしてマルトデキストリンのコンフォメーションの自由度が低下して構造を形成することが報告されている。<sup>20)</sup> 従って、マルトデキストリンにおいては e-OH 基の割合の大きい糖、すなわち重合度が高いほど加熱変性抑制効果も大きくなるという傾向は、せいぜい重合度 6 程度までであると考えられる。

**直鎖ポリオールおよび糖アルコールの分子構造とタンパク質の変性抑制効果との関連** 直鎖ポリオールでは、鎖長が長くなるにつれて、すなわち分子中の OH 基数が多くなるにつれて water-structure making 作用が大きくなり疎水性相互作用が安定化されるが、逆にペプチド

間水素結合を安定化する効果は弱まる<sup>22)</sup> と理解されている。

グリセロールの OH 基数は 3, meso-エリスリトールでは 4, キシリトールでは 5, D-ソルビトールでは 6 というようにポリオール鎖長が長いほど、そのポリオール分子中の OH 基数は増加する。我々の結果では、D-ソルビトール, meso-エリスリトールの順に変性抑制効果が高くなっており (Table 1), OH 基数の多い直鎖ポリオールほど加熱変性抑制効果も大きくなるという知見を支持した結果となった。さらに大泉らの結果<sup>6)</sup> も併せると、魚肉筋原線維タンパク質の加熱変性抑制効果は D-ソルビトール > キシリトール > meso-エリスリトール > グリセロールの順に大きいことになる (Fig. 4)。また、糖アルコールの重合度という観点からは、重合度 1 の D-ソルビトールの OH 基数は 6, 重合度 2 のマルチトール ( $\alpha$ -Glc (1 $\rightarrow$ 4) Sor) では OH 基数 9 で e-OH 基数 4, ラクチトール ( $\beta$ -Gal (1 $\rightarrow$ 4) Sor) では OH 基数 9 で e-OH 基数 3, 重合度 3 のマルトリイトール ( $\alpha$ -Glc (1 $\rightarrow$ 4)  $\alpha$ -Glc (1 $\rightarrow$ 4) Sor) では OH 基数 12 で e-OH 基数 7 というように重合度が高いほど、その糖アルコール分子中の OH 基数ならびに e-OH 基数は増加する。一方、今回用いた還元直鎖オリゴ糖の OH 基数および e-OH 基数は、各成分の値を数平均して求めるとそれぞれ 11.2, 6.1 である。我々の結果および大泉らの結果<sup>6)</sup> (Table 1) を併せるとマルチトールおよびマルトリイトールの結果が欠損するが、Fig. 4 に示したように魚肉筋原線維タンパク質の加熱変性抑制効果は、還元直鎖オリゴ糖 > ラクチトール > D-ソルビトールの順に大きいことになる。すなわち、OH 基数ならびに e-OH 基数が多い糖アルコールほど加熱変性抑制効果も大きくなった。さらにリボスクレアーゼ A の加熱変性抑制効果がマルチトール  $\approx$  マルトース > グルコース  $\approx$  D-ソルビトールであったという月向らの結果<sup>6)</sup> を加味すると、マルトデキストリン類の糖アルコールでは加熱変性抑制効果が構成単糖の重合度が高いほど大きいと考えられる。しかし、還元直鎖オリゴ糖の構成成分であるマルトデキストリン類の糖アルコール間の相互作用により水の構造化が相乗的に促進されるかどうかは不明である。さらに、糖類の場合と同様な理由から無条件に OH 基数が多いほど water-structure making 作用は大きくなるとであろう。

これまでに述べてきたように、マルトデキストリン類の混合物である直鎖オリゴ糖あるいはその還元物である還元直鎖オリゴ糖をタンパク質変性抑制の目的で使用する場合には、分子中の OH 基数や e-OH 基数、OH 基数と e-OH 基数のバランスおよび分子形状の指標となる重合度分布が重要な因子であることが明らかになった。しかし、いずれのポリオール間の相互作用により水

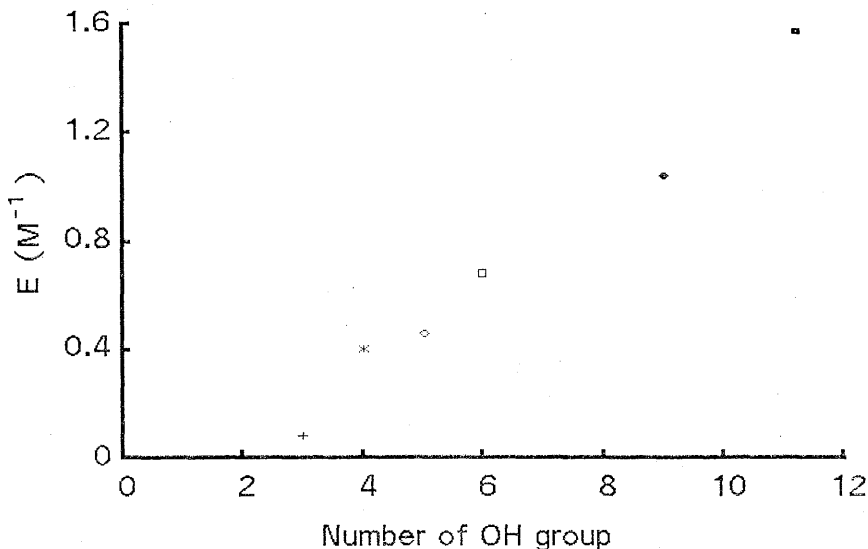


Fig. 4. Plots of  $E$  as a function of the number of OH groups per linear polyol and polyhydric alcohol molecules.

$E$  values are quoted from the data in Table 1.

+, glycerol; \*, meso-erythritol; ○, xylitol; □, D-sorbitol; ●, lactitol; ■, hydrogenated linear oligosaccharides.

の構造化が相乗的に促進されるのか、あるいはどの成分の効果が高いのかに関しては、高純度のポリオールを用いて1成分系、2成分系、次いで3成分系という具合に共存するポリオールの種類を増加させて、そのタンパク質変性抑制効果を検討していくことが考えられる。この分野での上記に記載したような更なる研究が期待される。

なお、本研究の最終目的である冷凍すり身における評価結果は、追って報告する。

#### 謝 辞

本研究を行なうにあたり、御指導を賜った北海道大学水産学部教授 新井健一博士ならびに青森県水産物加工研究所課長 福田 裕博士（現在、青森県内水面水産試験場）に深く感謝申し上げます。また、ポリオールによるタンパク質変性抑制機構に関して貴重なる御示唆ならびに御意見を頂いた名古屋大学農学部助教授 月向邦彦博士に深く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) K. Gekko and S. N. Timasheff: *Biochemistry*, **20**, 4667-4676 (1981).
- 2) K. Gekko and T. Morikawa: *J. Biochem.*, **90**, 51-60 (1981).
- 3) K. Gekko: *J. Biochem.*, **91**, 1197-1204 (1982).
- 4) K. Gekko and S. Koga: *J. Biochem.*, **94**, 199-205 (1983).
- 5) K. Gekko and Y. Idota: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 89-95 (1989).
- 6) 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一: 日本水誌, **47**, 901-908 (1981).
- 7) 大泉 徹, 奈良泰信, 新井健一: 日本水誌, **50**, 875-882 (1984).
- 8) 大泉 徹, 黒田哲弘, 新井健一: 日本水誌, **51**, 1717-1722 (1985).
- 9) 松本行司, 新井健一: 日本水誌, **52**, 2033-2038 (1986).
- 10) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一: 日本水誌, **47**, 857-867 (1977).
- 11) 新井健一: 水産物製品技術研究会誌, **10**, 385-394 (1985).
- 12) G. Gomori: *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 955-960 (1942).
- 13) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法 (関根隆光編), 南光堂, 東京, 1962, pp.13-14.
- 14) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1946).
- 15) M. J. Tait, A. Suggett, F. Franks, S. Ablett, and P. A. Quichenden: *J. Solution Chem.*, **1**, 131-151 (1972).
- 16) H. Uedaira and H. Uedaira: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 2451-2455 (1980).
- 17) H. Uedaira, M. Ishimura, S. Tsuda, and H. Uedaira: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3376-3379 (1990).
- 18) 矢野由紀, 謝名堂昌信: *TIGG*, **2**, 156-167 (1990).

- 19) K. Miyajima, M. Sawada, and M. Nakagaki:  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 1954-1957 (1983).
- 20) A. Sugget: in "Water, A Comprehensive Treatise" (ed. by F. Franks), Vol. 4, Plenum Press,  
New York, 1975, pp. 519-567.
- 21) D. A. Rees: *J. Chem. Soc.*, **B877** (1970).
- 22) K. Gekko: *J. Biochem.*, **91**, 1197-1204 (1982).