

## 〔総説〕

## ホヤの特殊金属濃縮に関する生化学的考察

## —とくにバナジウムを中心に—

## Biochemical Study on Vanadium Accumulation by Ascidians

小林 淳一・堀 令 司\*

JUN-ICHI KOBAYASHI AND REIJI HORI

194 東京都町田市 三菱化成生命科学研究所

\*930 富山市 富山大学理学部生物学教室

1980年10月6日受領

## I. はじめに

ホヤ (ascidian) がバナジウム (V) を濃縮していることを最初に見出したのは Henze (1911) である。彼はザラボヤ科 (Ascidiidae) の一種 *Phallusia mamillata* の特定の血球中に、バナジウムが高濃度で存在することを観察した。その後バナジウムの存在は、他の多くの種類のホヤでも確認されたが、なかにはバナジウムをほとんど含まないホヤがあることも判明した。しかも Endean (1955a) は、バナジウムが少ないとされているマボヤ科 (Pyuridae) の一種 *Pyura strombifera* がもっぱら鉄 (Fe) を濃縮していることをつきとめた。バナジウム含量によるホヤの分類は古くから (Webb, 1939) 試みられていたがバナジウムと鉄の相対含量とホヤの進化との関係が注目されるようになったのは比較的最近のことである (Swinehart *et al.*, 1974)。発生や形態などの生物学的特徴により、ホヤは扁鰓亜目 (Phlebobranchia)、無管亜目 (Aplousobranchia)、剛鰓亜目 (Stolidobranchia) に分類され、前者から後者へ向かうに従って進化の度合いが高いとされている (Millar, 1954)。Biggs and Swinehart (1976) によれば進化の度合いが低い扁鰓亜目では、血液にバナジウムを高濃度に蓄積するが、比較的進化度の高い無管亜目ではバナジウムの濃縮は特定の科に限られるようになり、最も進化の度合いの高い剛鰓亜目では、主に鉄を濃縮するという。

バナジウムや鉄などの金属がホヤにとってどのような生物学的意義をもっているかは Henze (1911) の発見以来4分の3世紀を経た今日ですらよくわからないことが多く、その役割についてもいくつかの

可能性が指摘されるにとどまっている (中内, 1977)。この問題に対する有力なアプローチの一つであるバナジウムの濃縮機構とくにバナジウムの濃縮に関連した化合物の検索は、これまで多くの研究がなされてきたが現在のところ明確な解答を与えるに至っておらず今後の研究に待つところが大きい。またホヤによる鉄の濃縮機構に関する研究はほとんど見当らない。したがって本稿では主としてバナジウムの濃縮に関連した化合物の生化学的研究を紹介し、その到達点をあきらかにするとともに著者らの研究についても言及し、今後の展望を考察したい。

## II. ヘモバナジン (hemovanadin)

ザラボヤ科のホヤではバナジウムは特定の血球中に高濃度で濃縮されている。Webb (1939) はこの血球を vanadocyte と呼んだ。*P. mamillata* では1個体当たりのバナジウム含量 (約 10 mg) の90%以上が血液中に存在し (Baltscheffsky and Baltscheffsky, 1953)、血球の約60%が vanadocyte に相当すると云われている (Webb, 1939)。vanadocyte にはバナジウム以外に多量の硫酸 ( $H_2SO_4$ ) と未知の含窒素化合物が存在し、当時この含窒素化合物はたん白質か (Henze, 1911)、あるいは低分子のピロール化合物 (Webb, 1939) と考えられた。Califano and Caselli (1948) はバナジウムを含めた vanadocyte 中のこれらの化学種を一つの系とみなし、ヘモバナジン (hemovanadin) と命名した。さらに血液の状態のちがいにより hemovanadin は3種に分類される。すなわち、生きた vanadocyte 中で淡緑色を呈している native hemovanadin は溶血後に赤褐色の red hemovanadin (または Henze's

solution) に変わり、さらにこれが酸化されると緑青色の blue hemovanadin (または Henze's chromogen) として沈殿する。hemovanadin に関する化学的研究は Bielig らにより精力的に行なわれ、その骨子が総説 (Bielig *et al.*, 1966) としてまとめられているので、以下にその要点を列記する。

1) 組織化学的には, vanadocyte は acidophile (メチルオレンジ染色で陽性) であり, 強い還元力 (オスミウム酸染色で陽性) を示す。

2) 磁気モーメントの比較からは red 及び blue hemovanadin のバナジウムの原子価は, それぞれ 3 価と 4 価である。酸化還元電位の値もこれらの原子価を支持する。

3) red hemovanadin の紫外吸収スペクトルは, 300 nm に低分子有機化合物, 425 nm に 3 価のバナジウムにそれぞれ由来する吸収を示す。

4) red hemovanadin 中の低分子化合物とバナジウムは化学量論的比率とともに透析膜を通過する。

5) 非透析性の無色のたん白質 (1.17 mg/ml red hemovanadin) は 280 nm に吸収極大をもつ塩基性たん白質 (等電点 7.9) で, アミノ酸分析より求めた分子量は 27,600 であるが, 沈殿分析からは 2 量体 (dimer) として存在するものと考えられる。

6) red hemovanadin 中のたん白質は遠心分離法により容易に低分子化合物から分離される。

7) pH 2.5 における red hemovanadin の電気泳動では, バナジウムイオン (3 価), 低分子化合物, たん白質は陰極へ移動するが硫酸イオンだけは陽極へ移動する。

8) red hemovanadin の酸化により沈殿物として生成する blue hemovanadin は, 分子式  $[C_{16}H_{19}N_3O_{12}]VO$  で表わされるバナジウム錯体である。

9) バナジウム除去後の低分子化合物 (淡黄色) は強い還元力をもち, L-アスコルビン酸と類似の enediol の反応を示す。

Bielig ら (1966) は以上の知見を総合し, vanadocyte のなかではバナジウム (3 価), 低分子化合物, たん白質, 硫酸イオンとの間で, pH に依存した相互作用が存在するものと推測している。この中で低分子化合物の還元力は, 海水中のバナジウム (5 価) を 3 価に還元するのに有効であるという。いくつかの成書たとえば Vallee and Wacker (1970) では, Bielig らの報告をそのまま引用し, hemovanadin をバナジウムを含む金属たん白質の一つとして取り扱っているが, その化学的根拠は上述のと

おり十分とは言い難い (中原, 1978)。彼等のデータからは, たん白質よりはむしろ低分子化合物がバナジウムとの錯体形成能をもっていると解釈した方がよいようである。

マボヤ科のホヤでは特定の血球 (ferrocyte) 中にバナジウムではなく鉄 (2 価) を濃縮することが Endean (1955a) により見出されている。彼によれば, ferrocyte 中には hemovanadin と類似の性質をもつ非透析性の化学種が存在するという。この ferrocyte が被のう形成に関与するという彼の説 (Endean, 1955b) が正しいとすれば鉄を含めた化学種もまた同じ目的のために機能していると考えerことは一応可能である。マボヤ科の金属濃縮に関する化学的研究は, これまでほとんどなく今後に期待される。

### III. ツニクロム (tunichrome)

Bielig らの報告 (1966) を含めたこれまでのホヤの研究は, 血球破壊 (hemolysis) 後の血液を対象としてきたために観察された化学種は少なからず人為的な影響を既に受けている可能性がある。Kustin ら (1976) は, この反省に立ち *Ascidia nigra* の溶血していない血液について, その分光学的性質を調べた。まず窒素気流中で取り出された血液は ESR (electron spin resonance) シグナルを示さない (3 価のバナジウムではこのシグナルを示さない) が, 空気中で酸化後の血液は,  $VO^{2+}$  (4 価) と同じ ESR シグナルを示すことが確認された。一方血球の PMR (proton magnetic resonance) では 20 ppm 付近に常磁性のバナジウム (3 価) に影響を受けた水のシグナルが確認された。同様な PMR シグナルは, *Ascidia ceratodes* の血球に対しても既に観察されている (Carlson, 1975)。Kustin らは, これらの結果を総合し, ザラボヤ科の血球ではバナジウムが 3 価で存在するものと解釈している。

さらに Kustin らは, *A. nigra* の血球の紫外吸収スペクトルが 335 nm に吸収極大を示し, かつ空気中で酸化後にはこの吸収が 325 nm にシフトすることを観察している。この 335 nm の吸収極大は Bielig ら (1966) の溶血後の値 (300 及び 425 nm) とはあきらかに異なっている。したがって Kustin らは, 前述の hemovanadin について Bielig ら (1966) が報告している値は, 人為的な結果によるものでないかと述べているが, 比較しているホヤの種類が異なる上に測定条件も異なっており, その真偽についてはさらに検討を要すると考えられる。

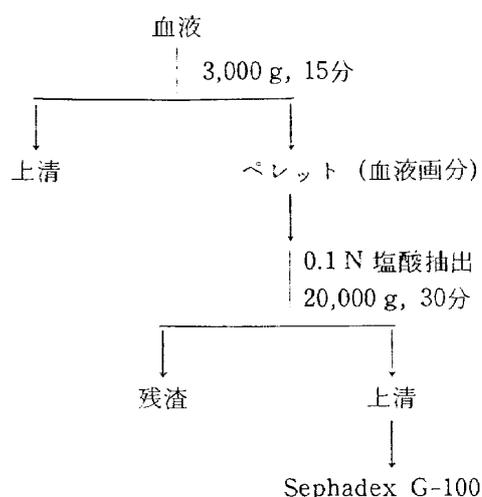


図 1. 血球中の低分子化合物の分離

一方 Macara ら (1979a) は、血球中でバナジウムと錯体を形成していると考えられる低分子化合物 (前述の blue hemovanadin に対応する) の分離を試みた (図 1)。窒素気流中で *A. nigra* の心臓より採取された血液は、遠心分離法により上清と血球分画とに分離された。血球分画は 0.1N 塩酸で振とう抽出後、遠心分離された上清は Sephadex G-100 のカラムで溶離された。そのカラムクロマトグラフィーでは、バナジウムや鉄が流出したのちに 330nm に吸収をもつ緑色のバンド (green chromogen) が分画された。同様の観察は既に Gilbert ら (1977) によってもなされている。これらの観察はバナジウムを含む血球 (vanadocyte) の緑色が、Bielig *et al.* (1966) のいう、バナジウム錯体に由来するだけではなく、その配位子 (ligand) にも由来することを示唆している。Macara ら (1979a) のこの観察と、血球の一種である緑色細胞 (green cell) がバナジウムを多く含まないという Kustin ら (1976) の観察とを考え合わせると green cell は必ずしも vanadocyte ではなく、あくまでも vanadium-rich cell が vanadocyte であると解釈すべきであろう。しかし現在のところ、vanadium-rich cell がどれかよく分っていない。

Macara ら (1979a) が分画した green chromogen は空気中での酸化により 330 nm の吸収を消失し、かつアミノ基を含まない (ニンヒドリン呈色で陰性) という。また血液そのものが酸素と可逆的な結合をしないという事実から、green chromogen が酸素の担い手 ( $O_2$ -carrier) であるとは考えにくいようである。

次に Macara ら (1979b) は、Sephadex LH-20 のカラムを用いて green chromogen を化学的分析が可能な量で分画し、その分画に含まれる化学種を新たにツニクロム tunichrome (被のう類 tunicate より分離した chromogen の意) と命名した。Sephadex LH-20 のカラムでは tunichrome は展開溶媒を水としたときにはゲルに吸着しメタノールでは流出される。*A. nigra* より分画された tunichrome の化学的性質は、Macara ら (1979b) によりかなり詳細に検討されているので以下にその諸性質を列記する。

1) シリカゲルの薄層クロマトグラフィーでは tailing するが概ね一つのスポットを与える。たとえば、メタノール溶媒で  $R_f=0.67$  である。

2) ベンゼンやクロロホルムには不溶である。

3) 凝固点降下法により求めた分子量 388 を仮定すると、元素分析値は C: 14.1, H: 22.2, N: 1.5, O: 10.6 (全量に対し 98.4%) の組成を与え、分画された tunichrome が複数個の化合物の混合物であることを示唆している。

4) 紫外吸収スペクトルでは、0.1N 塩酸中で 325 nm ( $\epsilon \sim 10,000$ ) に吸収極大を示し淡黄色を呈するが、pH 2.5~3.5 では 660 nm ( $\epsilon \sim 50$ ) にも吸収を示し緑色を呈する。

5) 赤外吸収スペクトルでは、 $1660\text{ cm}^{-1}$  及び  $1026\text{ cm}^{-1}$  にそれぞれ C=C 及び C-O 伸縮振動に由来する吸収帯が現われ、 $3300\text{ cm}^{-1}$  にも水酸基または結合水による O-H 伸縮振動に由来する吸収帯が現われる。

6) 90 MHz の PMR スペクトル (20 mg/ml ジメチルスルホキシド溶液) では、4.7, 6.3, 6.6, 6.9 ppm にビニル水素によるシグナルを与え、8.1, 8.8 ppm に線幅の広いシグナルと 10.1 ppm にアミド NH に由来するシグナルを与える。

7) 660 nm における酸塩基滴定曲線から求めた pKa は約 3 であり、カルボキシル基の存在を示唆する。

8) tunichrome 1 モル当たりの還元力は初期の速い反応で、5 価のバナジウムを 2 モル、または 3 価の鉄を 4 モル還元し、引き続き遅い反応では、3 価の鉄を 9 モル還元する。

9) pH 4 以上で急速に加水分解され、このとき tunichrome 1 モル当たり 13 モルのアルカリ ( $\text{OH}^-$ ) を消費する。この加水分解反応は、325 nm の吸収の消失と重合反応 (polymerization) を伴う。

*A. nigra* の血液 1 ml 当たりの tunichrome の

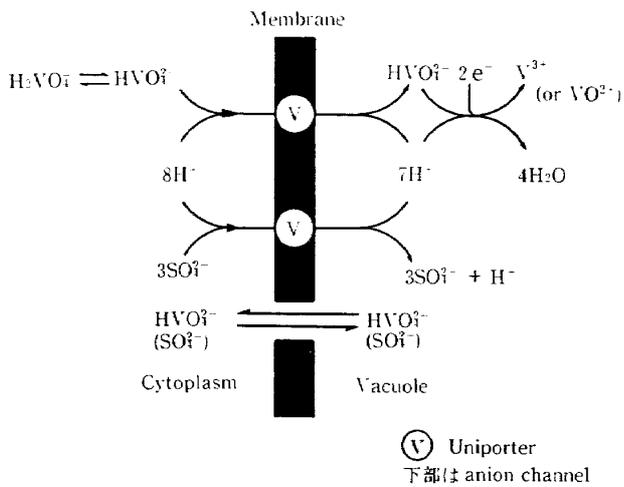


図 2. Vanadocyte 液胞のパナジウム濃縮モデル (Macara *et al.*, 1979b より作図)

含量が 1 mg である血球の約 60% が vanadocyte (Webb, 1939) と仮定すると vanadocyte 当たりの V 濃度は 0.2 M で、さらに vanadocyte 中の液胞容積 (vacuolar volume) 当たりでは、1.0 M の濃度になるという (Macara *et al.*, 1979b)。液胞中での tunichrome の濃度が、液胞中のパナジウムの濃度 (Carlson, 1975) とほぼ等しい (1 M) ことから、Macara ら (1979b, 1980) は、海水中の 5 価のパナジウムを 3 価へ還元するために液胞中に tunichrome が存在するものと考えた。以上の点を考慮に入れて、彼らは vanadocyte の液胞におけるパナジウム濃縮機構のひとつのモデルを提唱した (図 2)。モデルによれば海水から血球へ取り込まれた 5 価のパナジウム ( $\text{HVO}_4^{2-}$ ) は、液胞膜に存在する anion channel か、anion/proton uniporter を経て液胞内へ取り込まれ、ここで 4 価や 3 価へ還元されるが、これらの還元状態にあるパナジウムは、いずれも cation ( $\text{VO}^{2+}$  や  $\text{V}^{3+}$ ) として存在するために anion channel を通過できず結局は液胞内へ蓄積されるというものである。またこのモデルでは、パナジウム還元反応の際に消費されるプロトンの counter ion として硫酸イオン ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) も液胞内へ取り込まれるとしている。

Macara ら (1979c) は、*A. nigra* に加えて、ユウレイボヤ *Ciona intestinalis* 及びマンハッタンボヤ *Molgula manhattensis* についても、tunichrome の分画を試みている。*A. nigra* の血球中にはパナジウム (3 価) が多く含まれているが、*C. intestinalis* では血球よりも本体 (body) にパナジ

ウム (4 価) が多く、一方 *M. manhattensis* の血球中には鉄 (2 価) が多く濃縮されていることが確認された。*A. nigra* の場合 (Macara *et al.*, 1979a) と同様の方法で、抽出及び分画された *C. intestinalis* 及び *M. manhattensis* の tunichrome は、いずれも 270 及び 340 nm (*C. intestinalis* では、この吸収は肩に相当する) に吸収を示すがアルカリ (NaOH) の添加により加水分解され、340 nm の吸収は減少するという。彼らは、もし種々のホヤで tunichrome の構造が決定されるならば、ホヤの chemotaxonomy に有用であり、またこれに基づきホヤの系統樹が書きかえられるかもしれないことを示唆している。

Macara らが分画した 3 種のホヤの tunichrome は、パナジウムまたは鉄錯体の配位子 (ligand) である可能性が高く、その構造に興味をもたれるが、彼らの分画中には複数個の化合物が存在するものと推測され、さらに精製を要すると考えられる。また、彼らが提唱しているパナジウム濃縮機構のモデルでは、血球中の液胞内にパナジウムと硫酸を濃縮する過程をうまく説明できる反面、鉄の濃縮の場合についてはどうなのか、あるいは還元状態のパナジウムがさらに何と coupling しているのかを説明していない。後者の問いは、パナジウムの生物学的意義とも関連しており、この問いに対する回答は今後の研究の進展に待たねばならないであろう。

#### IV. パナジウムの役割

前節で述べてきた hemovanadin 及び tunichrome は、いずれもパナジウムの還元に関与する化合物として特徴づけられてきた。それではパナジウムそのものは、ホヤにとってどのような生物学的意義をもつだろうか。パナジウムの役割については、これまでにいくつかの可能性が指摘されているので、その主なものを以下に列記する。

1) 呼吸器系の酸素の運搬体 ( $\text{O}_2$ -carrier) とする説 (Carlisle, 1968)。

ホヤの血液は酸素を海水濃度以上に取り込めず、また酸素と可逆的な結合をしない (Macara *et al.*, 1979a) など不利な事実が多い。

2) 酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) の生成に関与 ( $\text{V}^{3+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{VO}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{e}^-$ ) するという説

生成された酸は何のために存在するのかという疑問があり、また酸はパナジウムの還元のために利用されるという全く逆の考え方 (Macara *et al.*, 1979b) もあり、卵とニワトリの関係を議論していることに

なりかねない。

3) 被のう形成に関与するという説 (Edean, 1955b)

バナジウムをほとんど濃縮しないホヤでも被のうは形成されるという事実がある。この場合は、バナジウムではなく鉄が関与するのかもしれない。しかし数 ppb のバナジウムを定量できる最近の分析化学のめざましい進歩はバナジウムをほとんど濃縮していないといわれるホヤについてもデータの見直しの必要性をせまっている。

4) 代謝における酸化還元系の溜(pool)とする説 具体的な有用性が知られていない。

5) 微生物に対する防御物質とする説 (Brown and Davies, 1971)

これも具体例が知られていない。

以上のように、いずれの説も客観的同意を得るためのデータが不十分であるが、被のう動物としてのホヤの生物学的特徴からは、3) の説の可能性が高いものと考えられる。

## V. 著者らの研究

マボヤ *Halocynthia roretzi* は、東北及び北海道地方で食用に供される比較的大型 (10~15 cm) の単体ボヤである。マボヤは、被のうと筋膜体 (mantle) との間に、約 100 ml の体腔液を含み、この体腔液は心臓から採取された血液とはほぼ同じ種類の血球を含む (Fuji, 1979) ことが知られている。

著者らは、バナジウムや鉄の濃縮に関連した化合物を検索する目的で、陸奥湾 (青森県浅虫) 産の養殖マボヤから体腔液を採取し、Macara ら (1979a) と類似の方法により分画した (図3)。各分画のバ

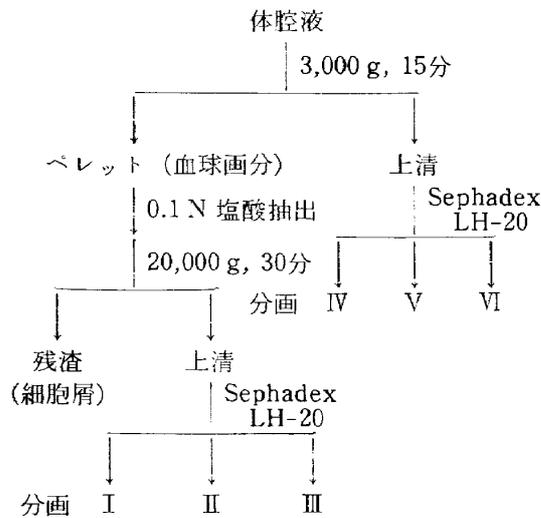


図3. マボヤ体腔液の分離

ナジウム含量は、立教大学原子炉 (Triga Mark II 型, 100 kW) を利用して放射化分析法により求めた。凍結乾燥重量当たりのバナジウム含量は、体腔液を遠心分離後のペレット (血球画分) と上清で、それぞれ約 4 及び 2 ppm で、Sephadex カラム分画後では、分画 II が約 11 ppm で一番多かった。一方原子吸光法により求めた体腔液の鉄の含量は、凍結乾燥重量当たりで、ペレットと上清は、それぞれ 400 及び 314 ppm であった。この観察はマボヤ科のホヤでは、バナジウムより鉄が多いとするこれまでの報告 (Edean, 1955a) と合致するものである。

ペレット抽出物の Sephadex カラム分画 I, II, III は紫外吸収スペクトルにおいて、いずれも 280 nm 付近に吸収極大をもつものに対して、上清の Sephadex カラム分画では、分画 IV が 318 及び 340 nm に、分画 V が 275 nm に、分画 VI が 295 nm に、それぞれ吸収極大をもつことがわかった。分画 IV を透析すると 318 及び 340 nm に吸収をもつ化合物は透析膜外へ出てしまい、透析膜内には 280 nm に吸収をもつ物質が得られた。アクリルアミドゲルを用いたディスク電気泳動で、分画 IV はたん白質に由来すると考えられる 3 本のバンドを示すので、280 nm に吸収をもつ非透析性の物質は、たん白質と推定される。

体腔液の Sephadex カラム分画 I, II 及び IV~VI は、いずれも水で流出する分画であるが、これに対して分画 III は溶離液が水の時キゲルに吸着し、メタノールで流出する分画である。この分画 III は、Macara ら (1979b) が tunichrome と呼ぶ分画に相当するが、紫外吸収スペクトルにおける吸収極大は Macara らが、*A. nigra* (325 nm), *M. manhattensis* (270 及び 340 nm), *C. intestinalis* (270 nm, 但し 340 nm に肩) の tunichrome に対して報告している値とは異なり、284 nm にその吸収を示す。高速液体クロマトグラフィー及び薄層クロマトグラフィーの分析からは分画 III は紫外吸収をもつ数種の混合物と推定される。また分画 III は、270 MHz の NMR において、種々のオレフィン水素 (-CH=CH-) のシグナルを与えており、この分画に含まれる化合物の構造に興味もたれる。

一方体腔液について、加水分解せずそのままアミノ酸分析を行なったところ、他のアミノ酸に比べて多量のタウリン (HO<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) が検出された。タウリンは、バナジウムが多いとされる *P. mamillata* の血液において、とくにその存在が確認されている (Bielig *et al.*, 1961)。多量に含まれるタウリンがホヤの血液中で単なる含硫アミノ酸の代謝

産物以上の機能たとえば硫酸を生成するために積極的に利用されているのかどうかは今後解明されるべき問題であろう。

## VI. 今後の課題

ホヤがバナジウムを濃縮するという Henze (1911) の発見以来、多数の研究者が種々のホヤについて特殊金属の含有量を報告してきたが、これまで報告された金属はバナジウムや鉄以外に、マンガン、ニオブ、タンタル、クロム、銅などであるが、一般にはバナジウムと鉄以外の金属については、生物濃縮の真偽が疑わしいとされている。しかもこれまでに報告されているバナジウムや鉄の含量を相互に比較しようとすると、一つの困難に遭遇する。それは、分析試料の調製法ならびに分析法が報告者により異なるために、データをそのまま対等なものとして比較できないということである。金属含量については、これまでのデータの洗い直しも含め、統一された方法による系統的な分析が今後望まれる。近年金属分析に有効な分析法であるといわれている原子吸光法も、バナジウムについては分析感度 (最大感度 20 ppb) ならびに精度は低く (IAEA, 1980)、試料中のバナジウムの原子価が異なる生物試料の場合には再現性がきわめて低いので、感度のよい放射化分析法による解析が推奨される (Hori and Numakunai, 1977)。

本稿で紹介したようにバナジウムや鉄が、どのような化合物の助けを借り、どのような機構を経て、ホヤの体内に濃縮されるのかは、依然として未解決の問題である。この興味ある難問を解明するためには、生物学者に加えて他分野 (無機、有機、生化学など) の研究者のこれまで以上の参画が必要となるであろう。

## 文 献

- BALTSCHIEFFSKY, H. AND M. BALTSCHIEFFSKY (1953) *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 24: 447-451.
- BIELIG, H. J., E. BAYER, H. D. DELL, G. ROHNS, H. MÖLLINGER AND W. RÜDIGER (1966) *Protides Biol. Fluid* 14: 197-204.
- BIELIG, H. J., E. JOST, K. PFLEGER AND W. RUMMEL (1961) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 325: 132-145.
- BIGGS, W. R. AND J. H. SWINEHART (1976) *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 6, ed. by H. Sigel, Marcel Dekker, New York, pp. 141-196.
- BROWN, A. C. AND A. B. DAVIES (1971) *J. Invertebr. Pathol.* 18: 276-279.
- CARLISLE, D. B. (1968) *Proc. Roy. Soc.* B171: 31-42.
- CALLIFANO, L. AND P. CASELLI (1948) *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 21: 261-271.
- CARLSON, R. M. K. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 2217-2221.
- ENDEAN, R. (1955a) *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 6: 35-59.
- ENDEAN, R. (1955b) *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 6: 157-164.
- FUKE, M. T. (1979) *Bull. Mar. Biol. St. Asamushi, Tohoku Univ.* 16: 143-159.
- GILBERT, K., K. KUSTIN AND G. C. MCLEOD (1977) *J. Cell. Physiol.* 93: 309-312.
- HENZE, M. (1911) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 72: 494-501.
- HORI, R. AND T. NUMAKUNAI (1977) *J. Radioanal. Chem.* 37: 605-610.
- IAEA (1980) *International Atomic Energy Agency, Vienna, Technical Report No. 197 Appendix II*: 351-367.
- KUSTIN, K., D. S. LEVINE, G. C. MCLEOD AND W. A. CURBY (1976) *Biol. Bull.* 150: 426-441.
- MACARA, I. G., G. C. MCLEOD AND K. KUSTIN (1979a) *Comp. Biochem. Physiol.* 62A: 821-826.
- MACARA, I. G., G. C. MCLEOD AND K. KUSTIN (1979b) *Biochem. J.* 181: 457-465.
- MACARA, I. G., G. C. MCLEOD AND K. KUSTIN (1979c) *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 299-302.
- MACARA, I. G. (1980) *Trends Biochem. Sci.* 5: 92-94.
- MILLER, R. H. (1954) *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 33: 681-687.
- 中内光昭 (1977) ホヤの生物学。東京大学出版会, pp. 112-118.
- 中原昭次 (1978) 錯体化学からみた生体系とそのモデル。化学総説 No. 20, 日本化学会編, 学会出版センター, pp. 12-19.
- SWINEHART, J. H., W. R. BIGGS, D. J. HALKO AND N. C. SCHROEDER (1974) *Biol. Bull.* 146: 302-312.
- VALLEE, B. L. AND W. E. C. WACKER (1970) *The Proteins*, vol. 5, ed. by H. Neurath, Acad. Press, New York, pp. 25-60.
- WEBB, D. A. (1939) *J. Exp. Biol.* 16: 499-523.