

## Chloramphenicolbenzoate (CMBA) に関する研究 (II)

## 分解酵素について

三共株式会社高峰研究所 丸山素弘・鈴木芳男・鈴木 稔

(昭和 30 年 8 月 12 日受付)

## 緒 言

前報で若干述べた様に、CMBA と CMPA の酵素的加水分解の様子は著しく異っている。その要点を簡単に繰返すと、

(1) CMPA は Lipase B (Bacterial Lipase; ROHM & HAAS), Pancreatin (林兼) によつてよく分解されるが、CMBA は殆んど分解されない。(2) 腸内容液による分解は常に CMBA の方が大である。(3) CMPA は血清で殆んど分解されないが、CMBA は略完全に分解される。(4) 又血清による CMBA の分解は、Eserine の添加によつて略完全に阻害する事が出来る。

之等の諸事実から CMBA 分解酵素は Lipase ではなく、恐らく非特異的コリンエステラーゼ (non-sp-ChE) である事が予想された。GLAZKO 等<sup>1)</sup>は CMPA 分解酵素を Lipase と推定したが、著者等の追試の結果も之を裏書きした。酸根のみが異なる 2 種の CM エステルが、異なる酵素で分解を受ける可能性が大きき、又コリンと CM との間に何等かの関連が示されるのではないかと期待されるので、CMBA 分解酵素の性状を更に詳細に検討する事とした。実験は 3 項目に分けられ、実験方法は夫々異なるのでその都度記載する事とした。

## 実験 I 酵素源と阻害剤

CMBA を分解する酵素は動物の各種臓器に広く分布している。即ち、肝、腎、腸管、腸内容液、血清、肺、脾、筋等に含まれ、特に前 5 者の分解能は強い。此の傾向はモルモット、ラット、家兎を通じ一般的なものである。分解能の強さは動物によつて異り、家兎、ラットは同程度に強く、モルモットは弱い。CMBA 分解酵素とその阻害剤との関係を検討するために、酵素材料として分解能の強い家兎及びラットの臓器ペーストを用い、阻害剤は ChE 阻害剤 4 種を用いた。

放血致死させた家兎及びラットの肝、腎、腸管、肺、脾を剔出、水洗した鉄鉢で細片とし、2 倍量の水を加えて Waring blender にかけて、ペーストを調整した。CMBA は 0.1Mol 濃度のものを 2% トラガント末懸濁液として用い、ChE 阻害剤として、DFP (Diisopropyl-fluorophosphate 住友化学)、TEPP (Tetraethylpyrophosphate 日本化工、(TEPP 35%, H. E. T. P. 15%, tri-

ethylphosphate 50% の混合物)), Eserine (Eserinesalicylate Merck), Neostigmine (Prostigmine methylsulfate 塩野義) を用いた。臓器ペースト 0.5cc を 4cc の Tyrode's sol. を含む試験管中に浮遊せしめ、阻害剤水溶液 0.5cc を添加して 30 分放置後、CMBA 懸濁液を加えてよく混和し、37°C の Monod Type の恒温振盪槽中で 2 時間連続振盪した。反応終了後直ちに上澄液 0.5~1cc を採取し、加水分解によつて生じた CM を前報に倣つて重層法で定量した。阻害剤の代りに水を添加したものについても同様に処理して対照とし、両者の分解率を夫々 A, B とすると、 $(B-A)/B \times 100$  の値を以つて阻害度が定義される。阻害剤の終末濃度は DFP, TEPP, Eserine は  $10^{-5}$  Mol, Neostigmine は  $10^{-4}$  Mol とした。第 1 表はその結果である。

第 1 表 CMBA 分解に対する ChE 阻害剤の阻害度 (%)

阻害剤(M) 酵素材料	ラ ッ ト				家兎 DFP $10^{-5}$
	DFP $10^{-5}$	TEPP $10^{-5}$	Eserine $10^{-5}$	Neostigmin $10^{-4}$	
肝	93	100	86	37	73
腎	92	99	94	22	94
腸管	93	99	21	*	92
肺	48	92	—	82	91
脾	63	90	81	65	92
血清	86	100	96	64	92

\* negligible

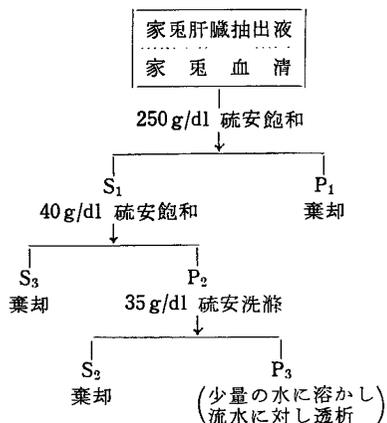
$$\text{阻害度} = \frac{\text{対照分解能} - \text{阻害剤加分解能}}{\text{対照分解能}} \times 100$$

TEPP の作用は最も強く、各臓器の分能を略完全に抑制する。DFP も大体同程度で、肺、脾に対する作用は若干弱い。Eserine は腸管の分解能を余り抑制しないが、他の臓器に対しては前 2 者と同程度の阻害である。Neostigmine の阻害作用は若干弱く、腸管には殆んど影響を与えず、肺、腎に対する作用も弱い。分解能と阻害度との間に直線的な関係はない様である。恐らくペースト中の夾雑物の影響があると考えられるが、此の点については後に触れる。此様に多少の例外はあるが代表的 ChE 阻害剤が強力に殆んど臓器の分解能を抑制する事が認められた。

### 実験 II 家兎肝臓及び血清より濃化酵素標品の抽出

CMBA 分解酵素の性状は non-sp-ChE と極めて類似しているので、ChE 抽出法に倣つて CMBA 分解酵素の濃化標品調整を試みた。ChE の精製法については、STEDMAN<sup>2)3)</sup>、STRELIZ<sup>4)</sup>、BADER<sup>5)</sup>、玉井<sup>6)</sup>、及びその他<sup>7)8)</sup>の方法があるが未だ純結晶は得られていない。著者等は STEDMAN 及び玉井の方法に準じて硫安蛋白分割を行い、数倍分解能の強い標品を得た。臓器としては実験室で入手容易で、且 CMBA 分解能の強い家兎肝臓及び血清を用い、抽出操作の概要を第 2 表に模式化した。CMBA 分解能を指標として分割を行つたが、肝臓を用いる場合には先づ肝臓ペーストを調整し、之に 2 倍量の水を添加して室温に 3 時間振盪抽出を行い、遠心分離して得た上清について操作し、血清はそのまま操作した。

第 2 表 CMBA 分解酵素標品の分割法



先づ 25 g/dl の硫安を添加し、1 時間静置して沈澱の成熟を待ち遠心分離する (3,000 r. p. m. 20 分)。沈澱 (P<sub>1</sub>) を棄て上清 (S<sub>1</sub>) に更に硫安を添加して 40 g/dl とする。約 3 時間静置した後遠心分離 (3,000 r. p. m. 20 分) して沈澱 (P<sub>2</sub>) を採り、之に 35 g/dl の硫安溶液を加え 30 分間振盪して洗滌を行う。30 分～1 時間静置後遠心分離して沈澱 (P<sub>3</sub>) を得る。血清の場合、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> を上記条件で遠心分離する事は困難なので、氷室中で常圧濾過を行つた。P<sub>3</sub> を少量の水に溶かし、セロファン膜を通して 2～3 日間流水透析を行つた。STEDMAN 及び玉井は夫々馬血清、犬肝臓を用いて同様な操作を行い、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> を得る際 N/2 酢酸を用いて pH を微酸性に調整する様指示しているが、著者等の実験によれば、調整を行わなくても結果に著変はなかつた。又 P<sub>2</sub> を直ちに少量の水に溶かし透析しても、透析液の分解能に大差はなく、乾燥量が増加する。玉井が得た分割部位も P<sub>3</sub> であるが、STEDMAN は S<sub>3</sub> に強い分解能を認めている。CMBA 分解能は、後述する Warburg manometer に

よるガス測圧法によつて測定したが、乾燥重量 1 mg の酵素標品によつて、30 分間に発生する CO<sub>2</sub> ml を以つてその標品の活性値とし、操作結果の 1 例を検討すると、抽出液の活性値 7.14 のものが分割により P<sub>3</sub> では 33.0 となり、4.62 倍濃化された事になる。抽出液及び透析液の全量の分解能では得量を求めると 25.7% である。一般に得量は 20% 前後、濃化は 4～5 倍の結果が得られる。本標品は橙色透明な液体で、12°C 内外の暗所に保存すれば月余に亘り活性値に著変はないが、0°C 以下の氷室中では却つて低下する傾向が認められ、凍結乾燥を行うと約半減する。肝臓標品の活性値は血清標品の 2～3 倍強力である。

### 実験 III 肝臓抽出濃化酵素標品の性状

実験 II で得た肝臓抽出標品について、各種基質に対する性状、pH との関係、塩類の影響、阻害剤、基質相互の関係等を検討した。分解能の測定は Warburg manometer を用いるガス測圧法によつた。基質溶液、Krebs-Ringer の 2.1 倍液、CO<sub>2</sub> 飽和 1.3% NaHCO<sub>3</sub> 溶液を調整し、その 1.0、2.0、0.8 cc を主室に、酵素液 0.5 cc を側室にとり、主室に水を加えて全液容を 5 cc とした。

ガス腔に 5% CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> 混合ガスを充塞し、37.5°C の恒温槽中に毎分 125 回振盪し、約 10 分間空振りして温度平衡に達せしめた後、酵素液と基質とを混和し、10 分毎に発生する CO<sub>2</sub> 量を測定した。通常 40 分間測定を続け、終りの 30 分間のガス発生量を以つて分解能とし、対照の分解能を 100 とすると相対活性値で比較を行つた。尚阻害反応の場合には、阻害剤を予め基質と共に主室に添加し、測定時間は特に 60 分間に延長した。基質の自家分解を補正するために、酵素液の代りに水を用いたものについて測定を行つたが、CMBA の自家分解は無視出来る程度であつた。Acetylcholine (Ace-Ch)、Benzoylcholine (Bz-Ch) の場合は無視出来ず補正を行つた。

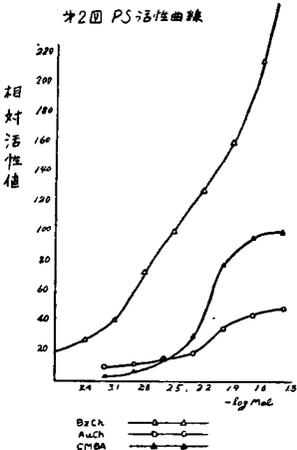
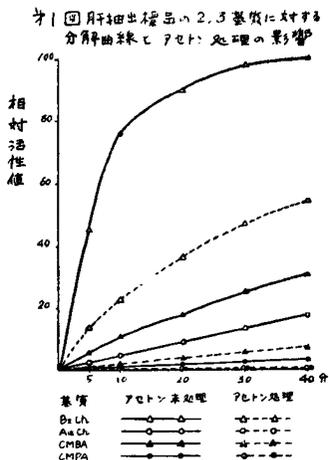
#### i) 基質による分解曲線の差

CMBA、CMPA、Ace-Ch、Bz-Ch を基質とし、酵素液と混和後発生する CO<sub>2</sub> 量を、時間に対して plot した分解曲線を第 1 図に示した。Ace-Ch、CMPA を基質とする場合は零次反応、Bz-Ch の場合は一次反応に近い分解曲線を示し、CMBA は両者の中間型である。即ち Ace-Ch の場合、ガス発生は測定時間中略々一定であるが、Bz-Ch は混和直後急速に分解が進行し、以後は緩慢となる。CMBA は測定時間の延長と共に次第に分解は緩慢となるが顕著ではない。Bz-Ch の場合、混和 10 分後から測定を行うと、分解が殆んど進行した後を測る事になるため、5 分後から 30 分間のガス発生量

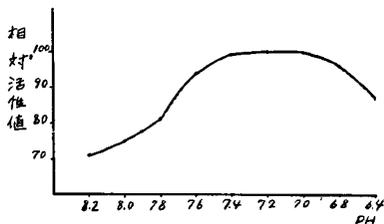
を以つて分解能とした。

ii) PS 活性曲線

基質濃度の対数に対して分解能をplotした所謂PS活性曲線を第2図に示した。特異的のChE (sp-ChE) の場合或る基質濃度で分解能はピークに達し、それ以上の濃度では却つて低下する所謂高濃度阻害の現象が認められているが、本標品は何れの基質に対しても此の現象はない。CMBA 及び Ace-Ch の場合  $3 \sim 5 \times 10^{-2}$  Mol 附近で分解能は max. に近づくが、Bz-Ch では此の附近から急速に増大する。基質濃度  $4 \times 10^{-2}$  Mol. に於ける相対活性値の比は CMBA:CMBA: Bz-Ch: Ace-Ch = 100:10:280:48 で Bz-Ch に対する分解能は最大である。



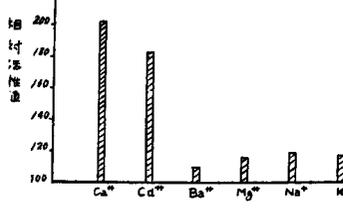
第3図 PHの分解能に及ぼす影響



iv) 塩類の分解能に及ぼす影響

Ca<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> の各塩化物の水溶液を調整し、

第4図 塩類の分解能に及ぼす影響



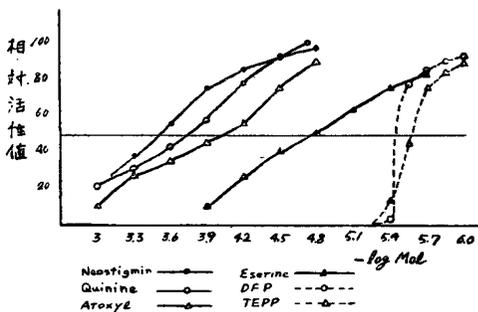
いた場合と略同じくした。 $2 \times 10^{-2}$  Mol CMBA を基質とし、1.3% NaHCO<sub>3</sub> 溶液 0.5cc 及び塩類のみを添加し、

Krebs-Ringer 溶液は用いない。又ガス腔は空気とし他の条件は前記同様とした。基質溶液に塩類を含めぬものを対照として分解能を比較した結果を第4図に示した。Ca<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup> の促進効果は大きく、対照の 200%, 185%。他は 110~120% の間にあり軽微の促進であつた。但し Na<sup>+</sup> は既に NaHCO<sub>3</sub> として含まれているので、此の値を直ちに Na<sup>+</sup> の効果と考える事は出来ない。

v) 各種阻害剤の影響

DFP(住友化学), TEPP(日本化工), Eserine(Merck), Neo-stigmine(塩野義), Atoxyl(三共試製品), Quinine(岩城製薬) の水溶液を調整し、終末濃度  $10^{-3} \sim 10^{-7}$  Mol に亘つてその作用を検討した。第5図に阻害剤添加時の相対活性値を示した。50% 阻害を示す Mol 濃度は、

第5図 各種阻害剤の影響



TEPP:  $20 \times 10^{-6}$ , DFP:  $3 \times 10^{-6}$ , Eserine:  $2 \times 10^{-5}$ , Atoxyl:  $9 \times 10^{-5}$ , Quinine:  $2 \times 10^{-4}$ , Neostigmine:  $3 \times 10^{-4}$  で TEPP, DFP の作用は最も強力である。又此の強弱の順序は実験 I の結果と一致している。TEPP, DFP の阻害曲線が殆んど直立しているのに対して、他の4者の勾配は緩慢である。前2者が ChE の非可逆的阻害剤であり、他が可逆的阻害剤である点から、本酵素標品が ChE に極めて類似した性状を持つ事が理解される。又 Atoxyl, Quinine が有効な点から、本酵素は活性 SH 基を持つ事が予想され、Na-Nitroprusside Test を行つたが結果は negative であつた。

vi) CMBA と Ace-Ch とを同時に基質とした場合 CMBA, CMBA, Ace-Ch, Bz-Ch は何れも本酵素標品によつて加分解される。之等分解が何れも CMBA

分解酵素によつて行われるものとすれば、之等基質を同時に添加すると基質相互間に拮抗関係が成立つ事が考えられる。此の関係を検討する便法として、基質と組合せた場合特定の基質濃度に於ける分解能に加成性 (additivity) が成立するか否かをみた。本標品の CMPA に対する分解能は微弱であり、Bz-Ch は基質濃度の増加に伴い分解能が急増するので、何れも此の関係を検討するのに不適當である。CMBA, Ace-Ch は基質濃度  $2 \sim 4 \times 10^{-2}$  Mol 附近で max. に近づき、基質濃度の僅かな変化によつて分解能が急変する様な事がない。従つて此の両者を用いて検討を行った。終末濃度を Ace-Ch :

$4 \times 10^{-2}$ , CMBA :  $2 \times 10^{-2}$  Mol とし、夫々を単独に基質とした場合、両者を同時に加えて基質とした場合の分解能を第 6 図に示した。50 分間の分解能と比較すると CMBA : 182 (A), Ace-Ch : 87 (B), CMBA + Ace-Ch : 190 (C) であり、 $A+B > C$  即ち分解能の additivity は成立しない。此の事実から直ちに

基質間の拮抗関係を推論し、CMBA, Ace-Ch の両者が同一酵素で分解すると結論する事は、些か飛躍しすぎるが、同一酵素である可能性は益々増したと言える。

### 考 察

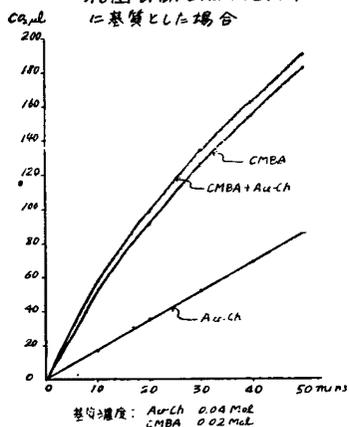
CMBA 分解酵素が non-sp-ChE である事を完全に同定するためには、non-sp-ChE を結晶として取出す事が必要である。ChE に就いては多くの報告があり、その性状も詳しく知られているが、結晶化は未だ成功していない。又基質に対する分解能によつて、sp-ChE, non-sp-ChE に分類されているが、此の分類も完全に満足すべきものではなく、SAWYER<sup>9)</sup> は別に Bz-ChE の存在を主張し、その他にも此の分類を不適當とする事実が知られて来ている。併し一般には之等の事実を例外として扱う方が従来の知識の整理に有利なため、此の分類規準が専ら用いられている模様である。著者等も此の分類法を採り、CMBA 分類酵素の性状を既知の non-sp-ChE の性状と比較すると、多くの点で類似が認められる。即ち、

(1) 分解酵素は多くの動物の、脳を除く殆んど総ての臓器に分布し、non-sp-ChE の分布が広範な点と類似している。又その分解能は ChE 阻害剤によつて強力に抑制され、家兎肝臓抽出標品に対する阻害剤の作用は、

ChE に対すると同一機構と考えられる阻害曲線を示した。(2) 基質に CMBA と Ace-Ch とを同時に添加する時、その分解能は夫々を単独に添加した際の分解能の和より著しく低い。之は両者を分解する酵素が同一である可能性を示す。(3) Ace-Ch を基質とする PS 活性曲線で高濃度阻害が認められなかつたが、sp-ChE には此の現象があり、non-sp-ChE にはない事が知られている。(4) 本酵素に SH 基の存在が予想されるにも拘らず、Na-nitroprusside Test の結果は Negative であつた。NACHMANSON<sup>10)</sup> は ChE に SH が存在する事を推定し、又此の SH 基の機能は organic arsenical によつて阻害される事が BARRON<sup>11)</sup>, QUASTEL<sup>12)</sup> 等により報告されている。又 STADIE 等<sup>13)</sup> は血清 ChE の SH 基は酸化剤に強く抵抗すると報告している。之等 SH 基の性状は本酵素標品の SH 基に類する性状と類似点が多い。(5) non-sp-ChE の至適 pH は 8.0~8.5 とされているが<sup>14)</sup>、玉井<sup>15)</sup> が家兎血清及び血球 ChE で得た値は 7.4 である。本標品の値は 7.0~7.4 で玉井の値に近い。(6) 金属イオンの影響は  $Ca^{++}$ ,  $Cd^{++}$  によつて賦活され、 $Mg^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  の効果は軽微であつた。ChE に対する金属イオンの効果に就いては種々の報告があり一定していない。此の理由の一部は種々の酵素材料から得た標品を、異つた条件で検討しているためとされている。従つて ChE と CMBA 分解酵素の関連性を検討する上に、本性状の比較を行う事は現状では意義が薄い。

Non-sp-ChE と総称される酵素の中に、例外的な性状を持つものが少くない事は既に述べた。従つて将来更に細分される可能性を含んでいるものである。CMBA 分解酵素は上記 (1)~(5) の性状が示す様に、non-sp-ChE の一般的性状とよく一致し、恐らく non-sp-ChE に属する酵素と考えて誤りないと思う。臓器ペーストは、濃化標品より ChE 阻害剤に対する抵抗性が大きい傾向が認められたが、同様な事実は他のエステラーゼを精製する際にも認められると言われ<sup>16)</sup>、不純物によると考えられているが、著者等の場合も蛋白分割の結果得られる活性の強い部位が  $P_3$  のみである点から、恐らく不純物によると考えられる。Non-sp-ChE は脾臓の主要なエステラーゼとされているが<sup>17)</sup>、著者等は市販の Pancreatin に CMBA 分解能を認め得なかつた。恐らく、Pancreatin の調整がアセトン分割法で行われた事によると思われる。ChE はアセトンで乾燥する時失活する事が知られ<sup>18)</sup>、著者等も肝抽出標品をアセトン処理した結果、分解能が激減する事を認めた(第 1 図参照)。Ace-Ch, CMPA に対する分解能は認められなくなり、CMBA, Bz-Ch に対する分解能は夫々 1/5, 1/2 に低下する。

第 6 図 CMBA と Ace-Ch を同時に基質とした場合



CMBA 分解酵素が SAWGER<sup>9)</sup> の Bz-ChE であると考えられる事は出来ない。Bz-ChE は家兎及びモルモットの肝臓に見出され、特に後者の分解能は強く、又 Ace-Ch より Bz-Ch を速かに分解する。本標品は基質に対する分解速度の点で Bz-ChE と類似しているが、第1報で述べた如く、モルモット肝臓の CMBA 分解能は低く、Bz-ChE に乏しいラット肝臓の方が遙かに強力であり、分布の点で著しく相違している。又著者等は CMPA は Lipase のみで分解され、CMBA は non-sp-ChE によつて分解されるとの予想の下に実験を行つたが、第1図に示した如く、肝抽出標品によつて CMPA も軽微ながら分解された。NACHMANSOHN 等<sup>17)</sup>によれば、non-sp-ChE の Acyl 系列 Cholinester に対する分解能は、butylester をピークとして減弱する事が知られている。同様な現象が non-cholinester にも適用し得るとすれば、palmiticester に対する分解能の低い事は当然考えられる。又 CMPA も CMBA 分解酵素によつて分解される事実から、CM とコリンとに或種の関連が存在すると予想されるが、此の点については今後検討したい。

#### 結 論

動物の各種臓器に含まれる CMBA 分解酵素の分解能は、ChE 阻害剤によつて強く抑制され、又家兎肝臓から蛋白分割の結果得られた分解能の強い部位は、玉井<sup>6)</sup>が犬 ChE として得た部位と一致した。此の標品の性状を列記すると、

1) ChE 阻害剤, DFP, TEPP, Eserine, Neostigmine によつて阻害を受け、Atoxyl, Quinine によつても阻害を受ける。

2) 基質に CMBA と Ace-Ch とを同時に用いた場合の分解能は、単独に基質とした際の分解能の和より低い。

3) SH 基の存在が予想されるが、Na-Nitroprusside Test の結果は negative であつた。

4) Ca<sup>++</sup>, Cd<sup>++</sup> は強い賦活作用を示し、至適 pH は 7.0~7.4 にある。

5) アセトン処理によつて分解能は激減する。之等性状は、既知の non-sp-ChE の性状と多くの点で酷似するもので、CMBA 分解酵素は non-sp-ChE であると考えられる。

御校閲を賜つた、東大伝研 山本郁夫教授、応微研 丸尾文治助教授、農化 松山晃氏に深謝する。尙本論文の要旨は第3回日本化学療法学会総会で発表した。

#### 文 献

- GLAZKO, A. J. & EDGERTON, W. H.: Chloromycetin palmitate. A synthetic ester of chloromycetin. *Antibiot. & Chemother.* 2 234 (1952).
- STEDMAN, E., STEDMAN, E. & EASSON, L. H.: Cholinesterase. An enzyme present in the blood-serum. *Biochem. J.* 26 2056 (1932).
- STEDMAN, E. & STEDMAN, E.: The purification of cholinesterase. *Biochem. J.* 29 2563 (1935).
- STRELITZ, F.: Studies on cholinesterase IV. Purification of pseudocholinesterase from horse serum. *Biochem. J.* 38 86 (1944).
- BADER, R., SCHÜTZ, F. & STACEY, M.: A crystalline serum mucoprotein with high cholinesterase activity. *Nature* 154 183 (1944).
- 玉井明: 犬の肝臓 Cholinesterase について。生化学 22 29 (1950).
- COHN, E. J., *et al.*: Preparation and properties of serum and plasma protein. IV. A system for the separation into fraction of the protein and lipoprotein components of biological tissues of fluids. *J. Am. Chem. Soc.* 68 459 (1946).
- SURGENOR, D. M., *et al.*: The separation of ChE, mucoprotein and metal combining protein into subfraction of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.* 71 1223 (1949).
- SAWYER, S. H.: Hydrolysis of cholinesters by liver. *Science* 101 385 (1945).
- NACHMANSOHN, D. & LEDRER, E. Some chemical properties of cholinesterase. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 130 321 (1939); *Biochemistry of cholinesterase (I) Preparation of the enzyme. Role of the sulfhydryl group.* *Bull. Soc. Chem. Biol.* 21 797 (1939).
- BARRON, E. S. G. & SINGER, T. B.: Enzyme systems containing active sulfhydryl groups. The role of glutathione. *Science* 97 356 (1943).
- QUASTEL, J. H. & GORDON, J. J. Effect of organic arsenic compounds on tissue enzymes and proteins and on tissue metabolism. *Nature* 159 97 (1947); Effect of organic arsenicals on enzyme systems. *Biochem. J.*, 42 337 (1948).
- STADIE, W. C., RIGGIS, B. C. & HAUGAARD, N.: Oxygen poisoning. VI. Effect of high oxygen pressure on enzymes, pepsin, catalase, cholinesterase, and carbonic anhydrase. 161 175 (1945).
- AUGUSTINSON, K. B.: Acetylcholinesterase and cholinesterase. The enzymes (edited by SUMNER, J. B. & MYRBÄCK, K.) Vol. 1, Part I, p. 460, Academic Press, New York, (1950).
- 玉井明: 赤血球と血清とに配分されている ChE の質的差異について。生化学 22 32 (1950).
- AMMON, R., & JAARMA, M.: The enzymes. Vol. 1, Part 1, p. 398 (1950).
- NACHMANSOHN, D. & ROTHENBERG, M. A.: Studies on ChE I. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. *J. Biol. Chem.* 158 653 (1945).