

[J. Ferment. Technol., Vol. 48, No. 1, p. 14~21, 1970]

菌体内核酸の自己分解による5'-ヌクレオチド 生産に関する研究

(第1報) *Candida utilis* による5'-ヌクレオチド分泌に対する
ホウ酸塩および界面活性剤の影響

北野 一昭・秋山 峻一*・福田 秀雄*

(武田薬品工業株式会社高砂工場・*醸酵生産物研究所)

Production of 5'-Nucleotides by Autodegradation of Intracellular Ribonucleic Acid of Yeast

(I) Influence of Borate and Surfactants on the Excretion
of 5'-Nucleotides by a Strain of *Candida utilis*

Kazuaki Kitano, Shun-ichi Akiyama* and Hideo Fukuda*

(Takasago Plant, Takeda Chemical Industries, Ltd., Takasago-city, Hyōgo-ken, Japan.

*Research and Development Division, Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)

The conditions of the excretion of 5'-nucleotides due to the degradation of endogenous ribonucleic acid (RNA) of a strain of *Candida utilis* were studied. It was found 5'-nucleotides scarcely excreted by this organism when its intact cells were incubated in a buffer solution with acetate, phosphate or glycine as a buffer with various values of pH. It was also found that 5'-nucleotides were excreted by the organism when incubated in a glycine buffer containing a certain surfactant with an alkaline pH. Surfactants useful for this activity were common cationics and nonionics having ether bonds. But under these conditions, the yield of 5'-nucleotides was not enough. On the other hand, borate buffers were found to be very useful for the excretion of 5'-nucleotides without adding any surfactant. Moreover, an addition of a surfactant under the presence of borate buffers worked out a complete degeneration of endogenous RNA into 5'-nucleotides and all the 5'-nucleotides formed were excreted outside the intact cells.

The optimum conditions for the 5'-nucleotides excretion by the intact cells when incubated at 33°C for 4 to 6 hrs., were as follows:

- | | |
|-----------------------------|---------------------|
| 1) optimum pH | 10.0~10.3 |
| 2) boric acid or borate | 0.1~0.25M |
| 3) surfactant concentration | 5~10% to dry cells. |

Under these conditions, the autolysis occurred specifically in endogenous RNA and other cell components with a high molecular weight were remained substantially unchanged.

緒 言

酵母によるヌクレオチド類の分泌については、すでに多くの報告がみられる¹⁻⁴⁾。中尾、緒方ら⁴⁾は多種類の酵母を各種 pH の緩衝液に懸濁してヌクレオチド類の分泌能を調べ、分泌の至適 pH などから酵母を 4 群に分類した。

一方、微生物による核酸系物質の分泌を促進させる方法としては、微生物生菌体を適当な緩衝液に懸濁させる方法¹⁻¹²⁾以外に、UV または X 線照射^{13,14)} 抗生物質処理^{15,16)}などが有効であることが知られている。また、微生物生菌体に陽イオン界面活性剤を作用させると菌体内物質の漏洩がおこること^{17,24-27)}、陰イオン界面活性剤がモノヌクレオチドの分泌に有効であること¹⁸⁾も知られている。しかし 5'-ヌクレオチドの分泌に関する報告はみあたらない。

著者らは 5'-ヌクレオチドを有利に生産するため、リボ核酸源としてきわめて有利に生産されるが、ヌクレオチド分泌能が弱いと考えられて来た *Candida utilis* の生菌体による 5'-ヌクレオチド分泌条件を詳細に検討した結果、ホウ酸塩および陽イオンまたは一部の非イオン界面活性剤の添加が特に有効であり、両者の併用によって、菌体内 RNA が定量的に 5'-ヌクレオチドとして分泌されることを見出したので、それらの結果について報告する。

実験方法

1. 供試菌株 *Candida utilis* B-2
2. 培養方法および菌体懸濁液の調製法 Table 1 に示した培地を用い、28℃で単槽連続通気攪拌培養した。対数増殖期の培養液を低温で遠心分離して集菌し、冷水で 2 回洗滌した後、菌濃度が 12% (乾燥重量として) となるように蒸留水に懸濁した。

Table 1. Medium composition for yeast culture.

Seed medium		Main medium	
Glucose	5 %	Cane molasses	10 %
Yeast extract	0.5	Urea	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.47	KH ₂ PO ₄	0.25
K ₂ HPO ₄	0.1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05
Na-Citrate	0.1	Yeast extract	0.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.03		
CaCO ₃	0.3		

3. 5'-ヌクレオチドの分泌方法 菌体懸濁液を等容の緩衝液と混ぜ合わせ、必要があれば薬剤を添加し、33℃で一定時間反応させた。

4. 分析方法 紫外外部吸収物質の分泌量は反応液を遠心分離して得られた上清の 260 mμ における吸光度から求め、冷酸可溶性物質は等容の 10% 冷過塩素酸を加え、生じた沈澱を除去した上清の 260 mμ における吸光度を測定して定量した。紫外外部吸収物質の分泌率は菌体懸濁液を 1 N カセイソーダ溶液中で 37℃ 18 時間保持するときに増加する冷酸可溶性の 260 mμ 吸収に対する分泌上清の 260 mμ 吸収の割合で求めた。

菌体懸濁液の RNA 量は Schmidt, Thannhauser and Schneider の方法¹⁹⁾により求めた。

5'-AMP の定量は *Brevibacterium vitarumen* 類縁菌²⁰⁾の 5'-ヌクレオチダーゼと牛小腸アデノシンデアミナーゼを使用し、Kalcker の方法²¹⁾に準じて行なった。5'-GMP の定量は 5'-ヌクレオチダーゼとグアノシンデアミナーゼ²²⁾を使用する石田らの方法によった。また、これらの定量にあたって沪紙電気泳動法を併用した。

5'-ヌクレオチドの生成量は 5'-AMP と 5'-GMP の量で代表させ、5'-ヌクレオチドの生成率は酵母 RNA 中の AMP+GMP 量をアルカリ分解物についてあらかじめ求め、これに対する生成 5'-AMP+5'-GMP の量比で求めた。

5'-ヌクレオチドの分離同定は Dowex-1 (ギ酸型) カラムクロマトグラフィーを用いた緒方らの方法²³⁾に準じて行なった。

実験結果および考察

1. 界面活性剤の 5'-ヌクレオチド分泌促進効果

A. 5'-ヌクレオチド分泌に対する *n*-ブタノールおよび界面活性剤の影響 種々の pH の緩衝液に酵母菌体を懸濁し、紫外外部吸収物質および 5'-ヌクレオチド類の分泌の有無を調べたが、Fig. 1-a に示すように、本菌はいずれの pH においても、紫外外部吸収物質をほとんど分泌しなかった。次に、酵母の自己消化を促進させるために、広く有機溶媒が用いられるが、本菌の 5'-ヌクレオチド分泌に対する *n*-ブタノールの影響をみた (Fig. 1-b)。紫外外部吸収物質の分泌はかなり促進されたが、5'-ヌクレオチドはいずれの pH においてもきわめて少量分泌されたにすぎなかった。これに対して陽イオン界面活性剤、ニッサンカチオン F-50 (Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride) を添加すると紫外外部吸収物質の分泌が促進され、とくに

pH 7 および pH 10 の緩衝液で顕著であった (Fig. 1-c). しかし 5'-ヌクレオチドは pH 7 のリン酸緩衝液ではきわめて少なく, 大部分は冷酸不溶性のポリヌクレオチドとして分泌されていることがわかった。

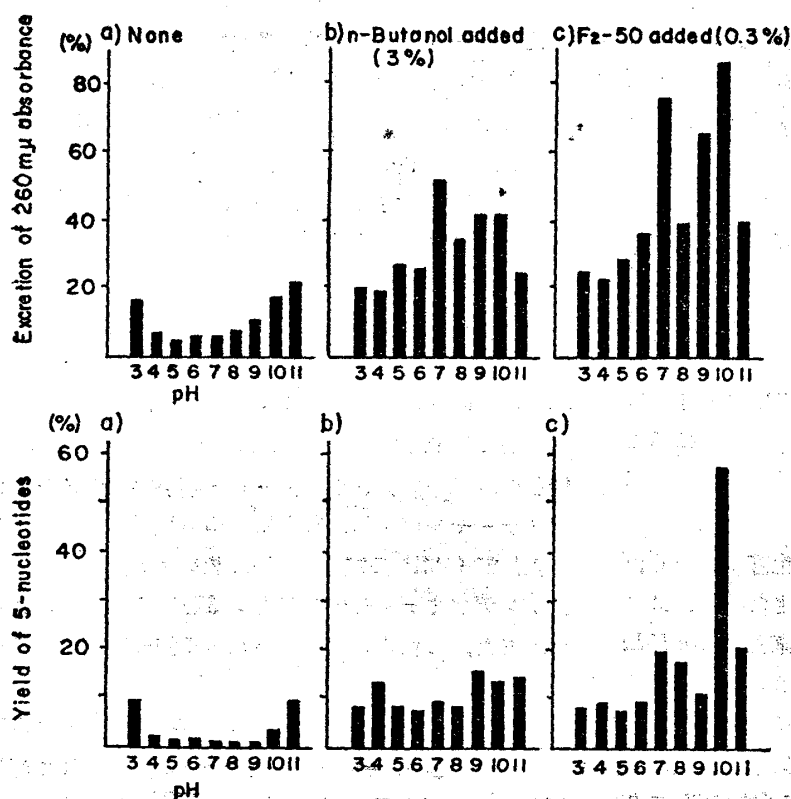


Fig. 1. Effects of *n*-butanol and a cationic surfactant F₂-50 on the excretion of U.V.-absorbing substances and 5-nucleotides.

Yeast cells were incubated for 4 hr at 33°C in the 0.25 M buffer solution of various pH.

pH 3~5: acetate buffer

pH 6~7: phosphate buffer

pH 9~11: glycine buffer

F₂-50 Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride.

Table 2. Effects of various surfactants on the excretion of 5'-nucleotides.

Concentration of surfactant: 0.3%

	Commercial name	Component	5'-Nucleotides formed	Yield (%)
Cationic	Cation AB	Trimethyl octadecyl ammonium chloride	705 μg/ml	25%
	Cation BB	Trimethyl dodecyl ammonium chloride	1757	61
	Cation PB-40	Trimethyl hexadecyl ammonium chloride	1713	60
	Cation F ₂ -50	Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride	1662	58
	Anstex N-100	Polyoxyethylene fatty amine	1756	61
	Sepanol	Alkyl hetero cyclic compound	1693	59
	CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide	1790	63
Anionic	Sintorex L-100	Sodium alkylaryl sulfonate	320	11
	Newlex C-1	Sodium alkylaryl sulfonate	287	10
	Rapizol B-30	Alkylester sulfonate of dibasic acid	409	14
Nonionic	Nonion HS-210	Polyoxy ethylene alkyl phenol ether	1814	64
	Nonion L-4	Poly ethylene glycol monolaurate	258	9
	Nonion S-4	Poly ethylene glycol monostearate	305	11
	Nonion O-2	Poly ethylene glycol monooleate	328	11
	OP-85R	Sorbitan trioleate	208	7
	ST-221	Polyoxy ethylene sorbitan monolaurate	308	11
None			248	9

Yeast cells were incubated for 4 hr at 33°C in 0.25 M glycine-NaOH buffer (pH 9.8).

これに対して pH 10 のグリシン緩衝液では大部分が 5'-ヌクレオチドとして分泌された。この結果から、本菌は中尾らの分類⁹⁾によると、アルカリ側で 5'-ヌクレオチドを分泌する型の菌であるといえる。

B. 界面活性剤の種類と分泌促進効果 このように界面活性剤が本菌の 5'-ヌクレオチド分泌を促進することがわかったので、界面活性剤の種類と促進効果の関係を調べた (Table 2)。すなわち、一般に陽イオン界面活性剤は有効であった。渡辺ら¹⁰⁾が葉外部吸収物質の分泌に効果を認めている陰イオン界面活性剤は、本菌における 5'-ヌクレオチドの分泌に対して効果が認められなかった。またいまだ、比較的検討されていなかった非イオン界面活性剤の中では、エーテル型のものだけが特異的に効果が認められたが、エステル型のものは無効であった。

C. 界面活性剤の濃度の影響 次に界面活性剤の添加濃度の影響を界面活性剤としてカチオン F₂-50 を選んで調べた結果 Fig. 2 に示すように反応液中 0.3% (乾燥菌体量当り 5%) 付近が至適でそれ以上の添加ではむしろ収率は低下した。

この他、反応温度、pH その他の条件についても種々検討を行なったが、5'-ヌクレオチドの生成収率は高々 60% 程度にすぎなかった。

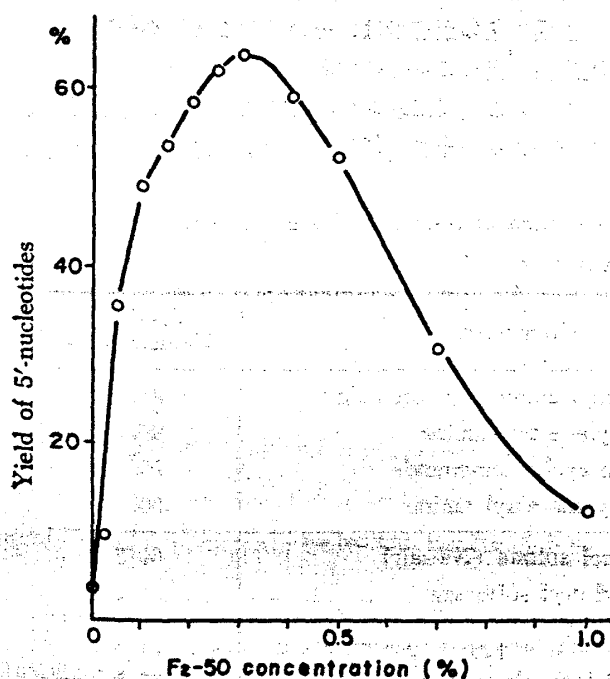


Fig. 2. Effect of concentration of the surfactant on the excretion of 5'-nucleotides.

Yeast cells were incubated for 4 hr at 33°C in 0.25 M glycine-NaOH buffer (pH 9.8).

2. ホウ酸塩の 5'-ヌクレオチド分泌促進効果

A. 塩溶液の組成の影響 次に塩溶液の組成の影響を調べた。緩衝力の弱いものについては、反応中 30% カセイソーダで pH 8.5~9.0 に調整した。得られた結果を Table 3 に示した。グリシン緩衝液では界面活性剤を添加しない場合には 5'-ヌクレオチドはわずかししか生成されなかったのに対し、ホウ酸塩の入った緩衝液では界面活性剤無添加でも 5'-ヌクレオチドがよく生成された。さらに界面活性剤を併用添加すると生成量が顕著に増大することを認めた。これに対してクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、炭酸ソーダ緩衝液、食塩水などでは界面活性剤を添加しても 5'-ヌクレオチドの生成はわずかであった。これらの結果から、ホウ酸塩は本菌における 5'-ヌクレオチドの分泌に対して、単なる pH やイオン強度の保持だけでなく、別の生理的な意義を有するものと推論される。

Table 3. Effects of various buffers on the excretion of 5'-nucleotides.

Buffer	Conc.	5'-Nucleotides formed	
		None	CTAB 0.1% added
	M	μg/ml	μg/ml
Glycine-NaOH	0.25	411	1612
H ₃ BO ₃ -NaOH	0.25	1804	2247
	0.125	442	2004
Na ₂ B ₄ O ₇ -NaOH	0.10	1709	2351
	0.05	234	944
Na ₂ B ₄ O ₇ -Na ₂ CO ₃	0.10	589	625
	0.05	1072	2234
KH ₂ PO ₄ -NaOH	0.125	0	459
NaHCO ₃ -Na ₂ CO ₃	0.25	0	294
NaCl-NaOH	0.20	210	635
Na ₂ HPO ₄ -NaOH	0.10	251	929
Citric Acid-NaOH	0.25	150	265

Yeast cells were incubated in each buffer with or without adding CTAB for 4 hr at 33°C.

pH was adjusted to pH 8.5~9.0 with 30% NaOH solution during the incubation.

B. ホウ素化合物の種類と促進効果 ホウ酸塩の作用がホウ素の作用なのかホウ酸イオンの作用なのかを知るために、各種ホウ素化合物の分泌促進作用を調べた。その結果は Table 4 に示す通りで、反応液中ホウ酸イオンを与えるような型のものに効果があり、有機ホウ素化合物などには効果が認められなかった。

Table 4. Effects of various boron compounds on the excretion of 5'-nucleotides.

Compound	Formula	Relative productivity	
		0.1 M	0.25 M
Boric acid	H_3BO_3	70	100
Borax	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	98	32
Potassium tetraborate	$K_2B_4O_7 \cdot 5H_2O$	95	28
Boric anhydride	B_2O_3	103	95
Sodium metaborate	$NaBO_2 \cdot 4H_2O$	106	64
Borontrifluoride ethercomplex	$BF_3(C_2H_5)_2O$	12	8
Sodium tetrafluoro borate	$NaBF_4$	10	8
Triphenyl borate	$(C_6H_5O)_3B$	12	18

The ratios were normalized to make the productivity in the case of 0.25 M boric acid equal to 100.

3. ホウ酸塩存在下での 5'-ヌクレオチド分泌に対する界面活性剤の影響

A. 界面活性剤の種類と分泌促進効果 ホウ酸塩存在下での 5'-ヌクレオチド分泌に対しても界面活性剤の効果が認められたので、この条件下での界面活性剤の種類と促進効果の関係を再度検討した。その結果グリシン緩衝液の場合と同様に、陽イオンおよびエーテル型非イオン界面活性剤が有効で菌体内 RNA は100%に近い収率で 5'-ヌクレオチドに分解され分泌蓄積された (Table 5)。

B. 分泌至適条件の検討 つぎに、ホウ酸塩としてホウ酸 (H_3BO_3) を使用した場合の 5'-ヌクレオチド生成条件について検討した。至適初発 pH は 0.25 M ホウ酸を使用した場合 pH 10.0~10.3 付近であるが

(Fig. 3)。反応中 5'-ヌクレオチドの生成にともなって pH が低下する傾向が認められた。そこで反応中液性をアルカリを補添しつつ一定に保った場合の至適 pH を求めると pH 8.8 付近であった。

ホウ酸の濃度は Fig. 4 に示すように、0.2 M 以下では収率は低下した。また、このホウ酸塩の一部を NaCl で置き換えても収率低下がみられ、したがって分泌を十分行なわせるために必要なホウ酸イオン濃度は 0.2 M 以上であることがわかった。なお、界面活性剤の種類によってこの条件はあまり変化しなかった。界面活性剤の至適量は、その種類によりやや異なるが乾燥菌体当たり 5~10% であった。

これらの結果にみられるように、ホウ酸塩は単独でも 5'-ヌクレオチドの分泌に効果があるが、収率は至

Table 5. Additional effects of surfactants on the excretion of 5'-nucleotides using borate buffer.

Concentration of surfactant: 0.3%

Form	Commercial name	Component	Yield of 5'-nucleotides
Cationic	CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide	94.2%
	Anstex N-100	Polyoxy ethylene fattyamine	90.7
	Sepanol	Alkyl hetero cyclic compounds	93.0
	Naimi in F-215	Polyoxy ethylene alkyl amine	96.0
Anionic	Sintolex L-100	Lauryl alcohol sulfate (Na-salt)	69.5
	Newlex C-1	Sodium alkyl aryl sulfonate	73.5
Nonionic	Nonion HS-210	Polyhydroxy ethylene alkyl phenol ether	99.3
	Nonion L-4	Polyoxy ethylene glycol monolaurate	76.5
	Nonion OP-85R	Sorbitan trioleate	63.5
None			60.5

Yeast cells were incubated for 4 hr at 33°C in 0.25 M borate buffer (pH 9.8).

適条件下においても 60% 前後で, グリシン緩衝液に界面活性剤を添加した場合と同じ程度である。しかし, ホウ酸塩存在下で界面活性剤を作用させた場合菌体内

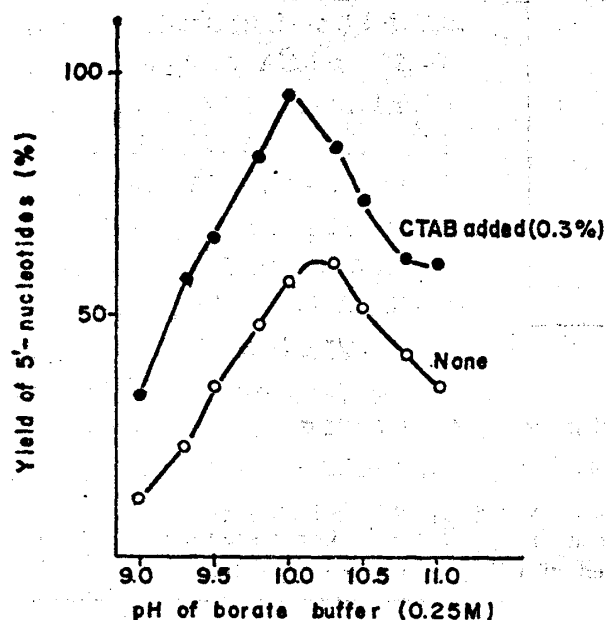


Fig. 3. Optimum pH of borate buffer on the excretion of 5'-nucleotides.

Yeast cells were incubated for 4 hr at 33°C in 0.25 M borate buffer of various pH with or without adding CTAB (0.3%).

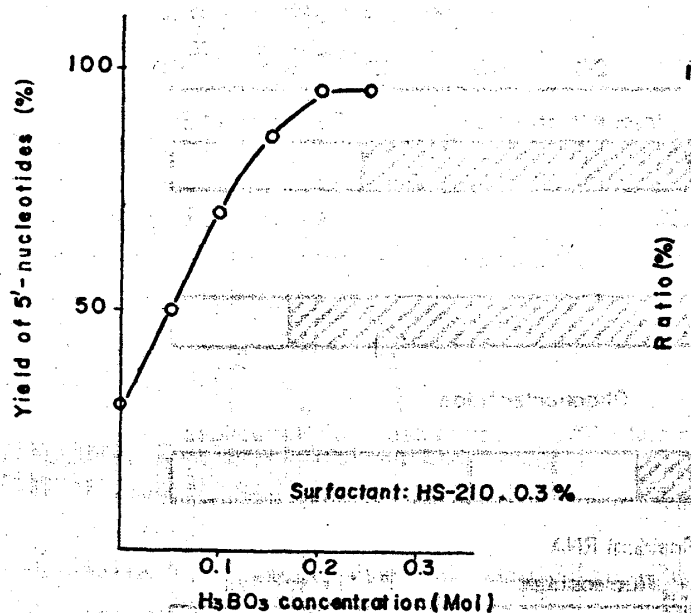


Fig. 4. Effect of H_3BO_3 concentration on the excretion of 5'-nucleotides.

Yeast cells were incubated in various concentration of borate buffer, adjusting the pH to 8.8 with 30% NaOH.

RNA はほぼ定量的に 5'-ヌクレオチドとして分泌された。

4. 分泌の時間経過および分泌物の同定 至適条件下での 5'-ヌクレオチド 分泌の時間経過の 1 例を Fig. 5 に示した。菌体内 RNA は約 4 時間で消失し、ほぼ 100% 5'-ヌクレオチドとして回収された。また生成した 5'-ヌクレオチドはさらに長時間反応をつづけてもほとんど減少せず、この条件では脱リン酸化反応はほとんど起っていないことがわかった。紫外部吸収物質の生成と 5'-ヌクレオチドの生成経過はほぼ一致し、反応のどの時間をとっても冷酸不溶性の紫外部吸収物質はほとんど分泌されていない。分泌物を Dowex-1 (ギ酸型) カラムクロマトグラフィーで分離したところ、Fig. 6 に示すように生成物はほとんど 5'-ヌクレオチドのみでヌクレオチド・ニリン酸、三リン酸、およびオリゴヌクレオチドなどはみとめられない。以上のことから、本条件では菌体内 RNA は 5'-ヌクレオチドにまで分解されてはじめて菌体外へ分泌されるものと考えられた。また分泌された 5'-ヌクレオチドの組成との RNA 組成を比較すると Table 6 に示すようによく一致した。ただ RNA の組成に比べて 5'-AMP の生成量が若干多いのは、菌体中の 5'-AMP 関連化合物から生じたものと推定される。

ホウ酸塩緩衝液を用いた場合の菌体成分、および RNA の物質収支をグリシン緩衝液を用いた場合のそ

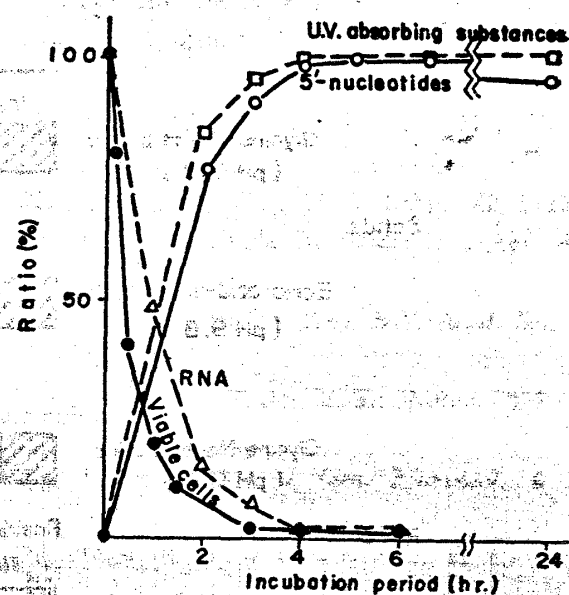


Fig. 5. A typical time course of the 5'-nucleotides excretion using borate and the surfactant.

Yeast cells were incubated in 0.25 M borate buffer and 0.4% of nonion HS-210 at 33°C, adjusting the pH to 8.8 with 30% NaOH.

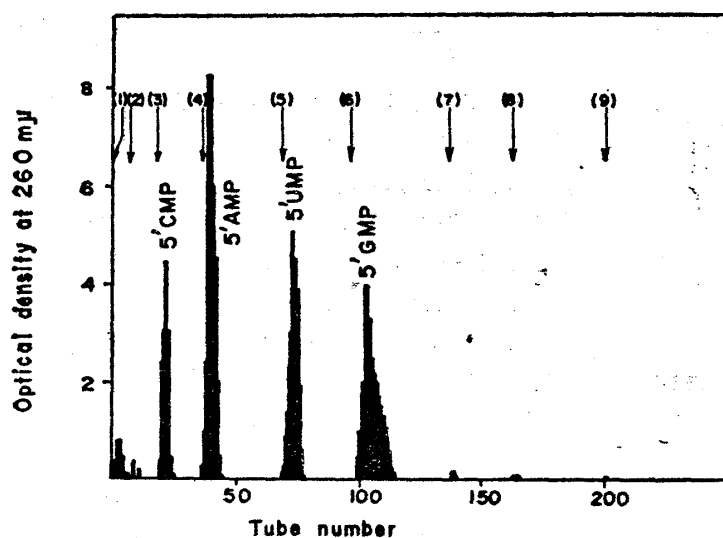


Fig. 6. Separation of excreted nucleotides by anion exchanger.

Exchanger; Dowe $\times 1 \times 8$ formate type, 200~400 mesh, $0.63 \text{ cm}^2 \times 8 \text{ cm}$.

Elution; Eluted with formic acid and sodium formate at the rate of 0.5 ml/min. Each 10 ml fraction was collected in a tube.

- (1) Adsorption & water (2) 0.005 M formic acid
 (3) 0.02 M formic acid (4) 0.1 M formic acid
 (5) 0.01 M formic acid + 0.05 M formate
 (6) 0.1 M formic acid + 0.1 M formate
 (7) 0.1 M formic acid + 0.3 M formate
 (8) 0.1 M formic acid + 0.4 M formate
 (9) 0.5 M formic acid + 0.5 M formate

れと比較して模式的に示したのが Fig. 7 である。ホウ酸塩緩衝液では菌体内RNAはほとんどが 5'-ヌクレオチドに分解されて分泌されるのに対し、菌体成分は 20% あまりが可溶化される。このうち 10~12% は RNA で、8~10% はその他の冷酸可溶性物質であるから、菌体内高分子物質は RNA 以外ほとんど自己消化されておらず、RNA に対してきわめて特異的な自己分解現象とみることができる。これに対してグリシン緩衝液では RNA 以外の物質もかなり自己消化され、それとともなって菌体成分の漏洩がはげしくなり、RNA が完全にモノヌクレオチドにまで分解されないうちにそれらの一部が分泌されて来た。

Table 6. Compositions of RNA and excreted nucleotides.

	RNA	Excreted nucleotides
5'-AMP	28.3%	30.2%
5'-GMP	27.8	26.8
5'-UMP	25.2	24.2
5'-CMP	18.7	18.8

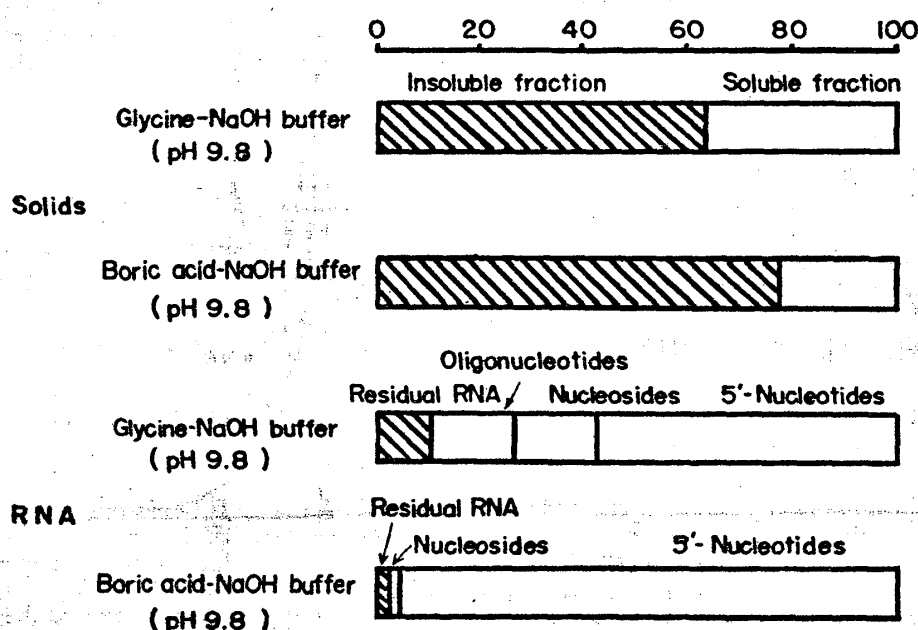


Fig. 7. Material balance of solids and RNA after incubation.

The reaction mixture was incubated for 6 hr. at 33°C.
 0.3% of nonion HS-210 was added to each buffer.

要 約

1) *Candida utilis* B-2 の生菌体を用い菌体内 RNA の自己分解による 5'-ヌクレオチド生成に対する界面活性剤および各種塩溶液の影響を調べた。

2) 本菌は陽イオンまたはエーテル型非イオン界面活性剤の存在下, アルカリ性 pH において菌体内 RNA の約 60% を 5'-ヌクレオチドとして分泌することを認めた。

3) 本菌における 5'-ヌクレオチド分泌に対して塩溶液の組成が大きな影響をおよぼし, ホウ酸塩が特に有効であることを認めた。

4) ホウ酸塩存在下における界面活性剤の効果について調べ, 両者の併用によって菌体内 RNA がほぼ定量的に 5'-ヌクレオチドとして分泌されることを見出した。

5) 5'-ヌクレオチド分泌の至適 pH は 10.0 付近, ホウ酸塩の至適濃度は 0.2~0.25 M, 界面活性剤の至適添加量は乾燥菌体当たり 5~10% であった。

6) 分泌生成物をイオン交換樹脂で分画し, 大部分が 5'-ヌクレオチドでありヌクレオシド, ヌクレオチドポリリン酸, オリゴヌクレオチドはほとんど存在しないことがわかった。

7) 分泌物のヌクレオチド組成は 5'-AMP を除き RNA のそれとよく一致した。

8) ホウ酸塩存在下における自己分解現象は RNA に対しきわめて特異的であった。

終りに臨み, 終始御指導御鞭撻を賜りました当社寺田案食品事業部次長, 醸酵生産物研究所長武田六郎博士, 同副所長石田安成博士, 食品研究所仲仁七部長, 醸酵生産物研究所中尾義雄博士に深謝します。

本報告の概要は昭和43年12月第17回アミノ酸核酸集談会シンポジウムにて発表した。

文 献

- 1) 桶口, 植村: 農化, **33**, 304 (1959).
- 2) 田中, 桶口, 植村: 農化, **36**, 978 (1962).
- 3) Tsukada, Y., Sugimori, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 429 (1964).
- 4) Nakao, Y., Imada, A., Wada, T., Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 151 (1964).
- 5) Hurst, R. O., Little, J. A., Butter, G. C.: *J. Biol. Chem.*, **188**, 705 (1951).

- 6) Holden, J. T.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **29**, 667 (1958).
- 7) Delamater, E. D., Babcock, K. L., Mazzanti, G. R.: *J. Bact.*, **77**, 513 (1959).
- 8) Stephenson, M., Mayle, J. M.: *Biochem. J.*, **45**, vii (1949).
- 9) Cohn, Z. A., Hahn, F. E., Celowski, W., Bozeman, F. M.: *Science*, **127**, 282 (1958).
- 10) Ogata, K., Imada, A., Nakao, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 596 (1962).
- 11) 今田, 中尾, 野上, 五十嵐, 緒方: アミノ酸・核酸, No. **8**, p. 118 (1963).
- 12) Sugimori, T., Tazuke, Y., Hamada, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 712 (1963).
- 13) Loofbrourow, J. R., Oppenheim, E. S., Loofbrourow, D. G., Yeats, C. A.: *Biochem. J.*, **41**, 122 (1947).
- 14) Billen, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 333 (1957).
- 15) Newton, B. A.: *J. Gen. Microbiol.*, **9**, 54 (1953).
- 16) Kinsky, S. C.: *J. Bact.*, **82**, 889 (1961).
- 17) 大林: 農化, **37**, 265 (1963).
- 18) 渡辺, 大沢, 山本: 本誌, **46**, 538 (1968).
- 19) Volkin, E., Cohn, W. E.: *Methods of Biochemical Analysis*, **1**, 287 (1954).
- 20) 富士谷, 中尾: 昭和41年4月農化関西支部例会報告.
- 21) Kalcken, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 445, 461 (1947).
- 22) 石田, 白藤, 米田, 富士谷: 農化, **43**, 1 (1969).
- 23) Ogata, K., Imada, A., Nakao, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 586 (1962).
- 24) Hotchkiss, R. D.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **46**, 479 (1946).
- 25) Gale, E. F., Taylor, E. S.: *Nature*, **157**, 548 (1946).
- 26) Salton, M. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 391 (1951).
- 27) Slade, H. D.: *J. Gen. Physiol.*, **41**, 63 (1957).

(昭 44. 8. 12 受付)