

[J. Ferment. Technol., Vol. 47, No. 1, p. 25~31, 1969]

## 植物種子発芽体の核酸分解酵素に関する研究

## (第 1 報) 核酸分解酵素の検索

川田 寛・片谷 健一・秋本 政明・西本 健市

(日本化学飼料株式会社)

## Studies on Nucleases in Sprouts of Plant Seeds

## (I) A Screening of Nucleases

Hiroshi Kawata, Ken-ichi Kataya, Masaaki Akimoto  
and Ken-ichi Nishimoto

(Nippon Chemical Feed Co., Ltd., Asano-cho, Hakodate, Hokkaido)

The activities of nuclease and phosphatase in sprouts of 25 species of plant seeds were studied.

1) In all of the sprouts, the nuclease and phosphatase activities were found. Most of these nucleases could hydrolyze RNA into 5'-mononucleotides characterized by periodic Schiff's reaction on paper-electrophoresis.

2) The nuclease activity is observed in seeds themselves. However, the activity was increased remarkably by germination, and it was at its maximum in three or four days after germination. Similar tendencies were observed in the phosphatase activity and the content of RNA.

3) The optimum pH of nuclease and phosphatase in the crude enzyme solution extracted from sprouts was found in both acidic (pH 4.5) and alkaline (pH 7.5) regions.

4) The distribution of the activities of ribonuclease, phosphodiesterase and phosphomonoesterase among the sections of a sprout was in the following order: root > shoot > cotyledon (or endosperm).

## 緒 言

植物種子発芽体の nuclease は、従来緑豆<sup>1~9)</sup>、小麦<sup>10,11)</sup>、大麦<sup>12)</sup>、rye grass<sup>13,14)</sup> およびトウモロコシ<sup>15,16)</sup>などについて多数の報告がある。しかし、これらについては全く見解が統一されていない。たとえば、緑豆発芽体の nuclease についてみても、Sung<sup>1)</sup>、原<sup>2)</sup>、守<sup>3)</sup>、石井ら<sup>4,9)</sup>は、至適 pH がそれぞれ pH 5.0、pH 5.0、pH 5.5、pH 5.5 にある 1 種の nuclease を報告しているが、Stockx ら<sup>2~4)</sup>は pH 5.0、5.2、5.6 に至適 pH を有する 3 種の nuclease を、また Walters ら<sup>5)</sup>

は pH 5.0、5.5 に至適 pH を有する 2 種の nuclease の存在を報告している。至適温度については、45°C<sup>2~4)</sup>、70°C<sup>6,7)</sup>および75~80°C<sup>8,9)</sup>などの報告があり、さ

RNase; Ribonuclease, 5'(3')-NDase; 5'(3')-Nucleotidase, DNase; Deoxyribonuclease, PNPase; Polynucleotide phosphorylase, PDase; Phosphodiesterase, DNPP; bis (*p*-nitrophenyl) phosphate, 5'-PDase; 5'-Phosphodiesterase, PNPP; *p*-nitrophenyl phosphate, PMase; Phosphomonoesterase, 5'-NpT; Thymidine-5'-*p*-nitrophenyl phosphate.

らに分解生成物については, 2', 3'-cyclic mononucleotide と 3'-mononucleotide を併成するもの<sup>9)</sup>, 5'-mononucleotide のみを生成するもの<sup>8,9)</sup> などの報告がみられ, 全く多様である。

筆者らは, 各種植物種子発芽体に含有せられる nuclease の実態をみきわめることを目的として本研究を行なった結果, 従来の知見とは異なり, 植物種子発芽体には, 酸性側のみならず, 酸性側とアルカリ性側の両域にわたって至適 pH を有し, しかもそれぞれ性質を異にする 2種~5種の nuclease と, 2種の phosphatase および PNPase などが存在し, きわめて複雑多様な酵素系より成ることが判明した。

本報告では, まず植物種子発芽体の nuclease の検索ならびにこれらの性質および分布などについて報告する。

### 実験方法

1. 試料 粳米, 小麦, 小豆, 青エンドウ, ササゲ, 黒豆, 大豆, インゲン豆, ソバなどは食用市販品を, ライ麦, カラス麦, 大麦, ヒエ, アワ, マイロ, トウモロコシ, イナキビなどは飼料用市販品を, アサガオ, 大根, 山東菜, ニンジン, ホーレン草, ナタネなどは種子用市販品を, また緑豆は, もやし製造用のビルマ産原料豆を用いた。

これらの種子を十分水洗し, 約30°Cの水床で適宜給水しながら発芽させ, 発芽3~4日の発芽体を供試した。

2. 酵素液の調製 発芽体に1~2倍量の冷水(5~10°C)を加え, ミキサー(8,000~10,000 rpm)で数分間磨砕し, 綿布による搾汁を酵素液とした。

#### 3. 酵素活性の測定

A. RNase 5.0% RNA 溶液 0.3 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.7 ml および酵素液 1.0 ml を 37°C, 30分間反応させ, ウラニル試薬 0.4 ml を加えて反応を停止させた。これを30分間氷冷のち遠心分離(4,000 rpm)し, 上澄液 0.1 ml を 10 ml に希釈して, 260 m $\mu$  における吸光度を測定し, 酵素液 1 ml 換算値を1,000倍して活性単位とした。

B. PDase CaDNPP は, Garilhe ら<sup>17)</sup>の方法で調製し, 中尾ら<sup>18)</sup>の方法を改変して活性を測定した。すなわち, 10 mM CaDNPP 溶液 1.0 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2.0 ml および酵素液 1.0 ml を 37°C, 30分間反応させ, 1N NaOH 溶液 1 ml を加えて反応を停止させたのち遠心分離した。この上澄液のうち, 2.0 ml を 10 ml に希釈して 420 m $\mu$  における吸光度 (A) を測定し, 一方別の 2.0 ml について,

リンバドモリブデン酸法により遊離リンを測定し, 遊離リンの測定値に対応する理論量の PNPP を求め, これを別に作成した *p*-nitrophenol の標準線より 420 m $\mu$  の吸光度 (B) に換算して (A-B) を求め, 酵素液 1 ml 換算値を1,000倍して活性単位とした。

C. PMase 1.0 mM PNPP 溶液 1.0 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 2.0 ml および酵素液 1.0 ml を 37°C, 15分間反応させたのち, 1N NaOH 溶液 1.0 ml を加えて反応を停止させ, 遠心分離のち上澄液の 420 m $\mu$  における吸光度を測定し, 吸光度の1,000倍を活性単位とした。

D. 5'-PDase Razzell ら<sup>19)</sup>の方法にしたがって合成した 5'-NpT を基質とし, 松下ら<sup>20)</sup>の方法を改変して測定した。すなわち, 10 mM 5'-NpT 溶液 0.1 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.2 ml および酵素液 0.2 ml を 37°C, 30分間反応させたのち, 0.1N NaOH 溶液 2.5 ml を加えて反応を停止させ, 遠心分離のち 420 m $\mu$  における吸光度を測定し, 酵素液 1 ml 換算値を1,000倍して活性単位とした。

E. PNPase 今田ら<sup>21)</sup>の方法を改変して行なった。すなわち, 0.1% ADP 溶液 0.25 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 1.25 ml および酵素液 0.5 ml を 37°C, 60分間反応させたのち, 10%過塩素酸溶液 2.0 ml を加えて反応を停止させ, 遠心分離した。このうち 1.0 ml を 10 ml に希釈して 260 m $\mu$  の吸光度を測定し, 同時に行なった盲検値を差引き, 酵素液 1 ml 換算値を1,000倍して活性単位とした。

4. Nuclease の検索 2% RNA (和光純薬製酵母 RNA を浅野<sup>22)</sup>の方法に準じて精製した) 溶液 0.5 ml, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1.0 ml および酵素液 0.5 ml よりなる反応組成で, 60°C, 2時間の反応を行なったのち, ウラニル試薬 (25%過塩素酸溶液に酢酸ウラニル 0.75%を含む) 0.4 ml を加えて反応を停止させた。これを氷冷のち遠心分離し, 上澄液の 260 m $\mu$  における吸光度と遊離リンを測定し, 緒方ら<sup>23)</sup>の方法によって, 分解率はアルカリ分解値に対する比率から, リン遊離率は, 全リン値に対する遊離リンの比率からそれぞれ求めた。生成 mononucleotide の異性体の確認は, 東洋沱紙 No. 51A を用いて国中ら<sup>24)</sup>の方法にしたがって沱紙電気泳動を行ない, Buchanan ら<sup>25)</sup>の方法による過ヨード酸シッフの反応の呈色により判定した。

5. RNA 量と蛋白量の測定 RNA は, 各務の方法<sup>26)</sup>にしたがって脂質の除去, 酸可溶性物質の除去, ついで RNA の抽出を行ない, リンバドモリブデン酸法によって有機リンを定量し, RNA の有機リン

Table 1. Degradation of RNA by the crude enzymes extracted from sprouts of various plant seed.

Common name	(Genus)	Germinating periods (days)	Apparent degradation of RNA* (%)	Phosphorus liberated** (%)	Periodate Schiff's reaction***
Rice	( <i>Oryza sativa</i> L.)	3	82.3	18.5	(+)
Wheat	( <i>Triticum aestivum</i> L.)	4	85.4	9.4	(+)
Rye	( <i>Secale cereale</i> L.)	4	97.6	12.0	(+)
Oats	( <i>Avena fatua</i> L.)	4	64.6	15.0	(+)
Barley	( <i>Hordeum hexastichon</i> L.)	3	100.7	31.0	(+)
Red bean	( <i>Phaseolus angularis</i> Wight.)	4	86.6	10.5	(+)
Mung bean	( <i>Phaseolus aureus</i> Roxb.)	4	91.5	8.4	(+)
Green bean	( <i>Pisum sativum</i> L.)	4	79.6	25.4	(+)
Cow-pea	( <i>Vigna Catang</i> Endle var. <i>sinensis</i> King.)	3	75.7	3.7	(+)
Black soy bean	( <i>Glycine Max</i> Merrill.)	4	40.9	10.4	(-)
Soy bean	( <i>Glycine hispida</i> Maxim.)	4	53.4	13.2	(-)
Kidney-bean	( <i>Dolichos Lablab</i> L.)	4	40.9	10.2	(±)
Barnyard grass	( <i>Panicum Crusgalli</i> L. var. <i>frumentaceum</i> Trin.)	4	80.2	6.0	(+)
Millet	( <i>Setaria italica</i> Beauv.)	3	84.8	13.8	(+)
Milo maize (native to U. S. A)	( <i>Sorghum vulgare</i> .)	4	92.1	35.6	(+)
Milo maize (native to China)	( <i>Sorghum vulgare</i> .)	4	77.0	36.0	(+)
Buck wheat	( <i>Polygonum Fagopyrum</i> L.)	3	24.0	2.5	(+)
Corn	( <i>Zea Mays</i> L.)	4	56.7	42.1	(+)
Millet	( <i>Panicum miliaceum</i> L.)	4	72.0	16.6	(-)
Morning glory	( <i>Conval vunius</i> Nil L.)	3	81.4	16.7	(+)
Japanese radish	( <i>Raphanus acanthiformis</i> Morel.)	3	91.0	57.5	(+)
Cabbage	( <i>Brassica pekinensis</i> Rupr.)	3	88.5	56.5	(+)
Carrot	( <i>Daucus Carota</i> L. var. <i>sativa</i> DC.)	3	84.5	10.5	(+)
Spinach	( <i>Spinacia oleracea</i> L.)	3	85.2	13.9	(+)
Rape-seed	( <i>Brassica campestris</i> L. subsp. <i>Napus</i> Hook. fil. et Anders. Var. <i>nippo-oleifera</i> Makino)	3	76.2	45.0	(-)
0.3 N KOH degradation (control)			100.0	0	(-)

\* : Calculated from the equation  $(T/D \times 100)$ . T is the optical density at 260m $\mu$  of the enzymatic hydrolysate. D is of the alkaline hydrolysate. 10mg yeast RNA was hydrolyzed with 0.5ml of crude enzyme solution at pH 5.0, 60°C for 120 min.

\*\*\* : The color development of the ultraviolet absorbing spots on the paper-electrophoresis is shown as follows : distinct blue, (+), indistinct blue, (±) and purple, (-).

\*\* : Calculated from the equation  $(P_i/T \times 100)$ . P<sub>i</sub> is the amount of free phosphorus in the hydrolysates determined by the method of Fiske-Subbarow. T is the total phosphorus determined by the same method.

を9.0%として算出した。蛋白は、ケルダール法で測定したほか、280 m $\mu$  における吸光度をもって表わした。

結 果

1. Nuclease の分布と分解生成物

各種植物種子発芽体より抽出した酵素液について、nuclease の検索を行なった結果、Table 1 に示すように、すべての発芽体に RNase と phosphatase 活性が認められ、またほとんどすべての発芽体には、RNA を分解して 5'-mononucleotide を生成する nuclease の存在が認められた。

2. 発芽中における RNase, PMase,

RNA の変化 緑豆, 小麦, アワ, 大根などの種子を選び、発芽中における各酵素活性を比活性で、RNA 含量を乾物値で表わし、それぞれの消長を Fig. 1 に示した。すなわち、各種の種子はいずれも発芽によって酵素活性と RNA 含量を増加し、これらは発芽3~4日で最大となった。なお、未発芽種子にも RNase 活性が認められたので、小麦、緑豆、大麦などの種子と、これらの発芽体およびホーレン草の葉、ニンジンの根、ジャガイモなどの RNase 活性を比較し、その結果を Table 2 に示した。すなわち、RNase 活性は種子そのものに比べ、発芽することによって、同重量種子当り、緑豆では約7倍に、小麦、大麦では2~2.5倍に増加した。ホーレン草の葉、ニンジンの根およびジャガイモなどの

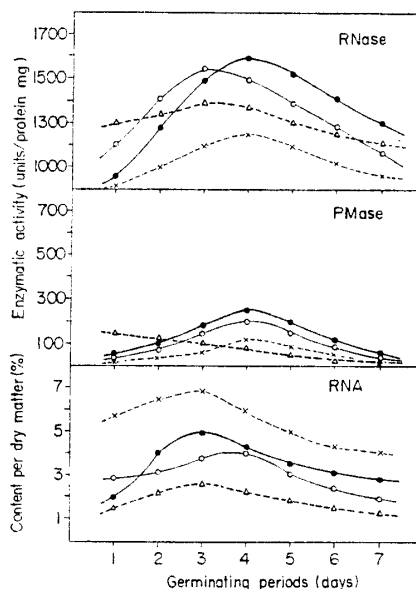


Fig. 1. Changes in enzymatic activities and RNA content of some sprouts during course of germination.

The measurements of the enzymatic activities, RNA content and protein concentration were determined as follows.

RNase: Reaction mixture containing 15mg of RNA, 0.7 ml of 0.1M acetate buffer solution (pH 4.5) and 1.0 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 30 min. After stopping the reaction by adding McFayden's reagent and centrifugation, optical density of the supernatant was measured at 260 m $\mu$ .

RMase: Reaction mixture containing 1  $\mu$  mole PNPP, 2.0 ml of 0.1M acetate buffer solution (pH 5.0) and 1.0 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 15 min. After stopping the reaction by adding 1N NaOH and centrifugation, optical density of the supernatant was measured at 420 m $\mu$ .

RNA content: Determined by the improved method of Kagami<sup>26</sup>.

Protein concentration: Determined by the Kjeldahl method.

- Mung bean                    ×---× Millet
- Wheat                        △---△ Japanese radish

Table 2. Comparison of RNase activities in seeds, sprouts and vegetables.

	Mung bean		Wheat		Barley		Spinach leaves	Carrot roots	Potato tubers
	seed	sprout	seed	sprout	seed	sprout			
Raw material (g)	100	100*	100	100*	100	100*	100	100	100
Sprouts (g)	—	1,000*	—	500*	—	500*	—	—	—
Added water in extracting (ml)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	200	500	500
Crude enzyme solution (ml)	900	1,800	900	1,200	900	1,200	230	570	580
RNase activity (units/ml)	4,800	16,800	6,000	8,400	5,280	9,960	15,600	5,040	1,320
Total RNase activity ( $\times 10^3$ units)	4,320	30.240	5,400	10,080	4,800	12,000	3,600	2,880	7,680

\* Each 100g seed increases the weight to 500g or 1,000g by germination respectively. The germinating periods are shown in Table 1.

活性は、同重量当り緑豆発芽体の 1/8~1/40 にすぎなかった。

3. RNase, PMase および PNPase の至適 pH

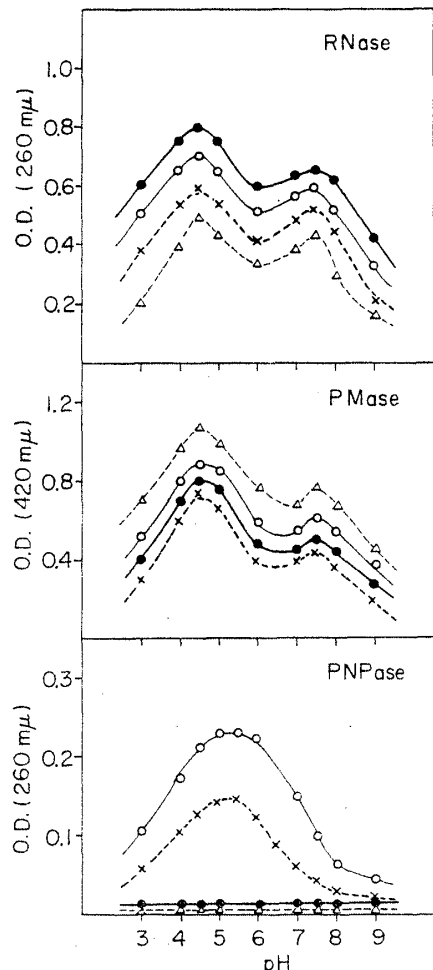


Fig. 2. pH-Activity curves of RNase, PMase and PNPase in the crude enzymes extracted from some sprouts.

Germinating periods: See Table 1.

RNase and PMase: See Fig. 1.

PNPase: Reaction mixture containing 0.25 mg of 5'-ADP, 1.25 ml of 0.1M acetate buffer solution (pH 5.5) and 0.5 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 60 min. After stopping the reaction by adding 10% perchloric acid and centrifugation, the decrease of optical density of the supernatant was measured at 260mμ.

Buffer used: pH 3-6, 0.1M acetate buffer solution, pH 7-9, 0.1M tris buffer solution.

●—● mung bean, ×---× millet  
○—○ wheat,  
△---△ Japanese radish

RNA, PNPP および 5'-ADP などの基質に作用させて、各作用至適 pH を求めた。この結果は Fig. 2 に示すように、いずれの発芽体においても、RNase と PMase の至適 pH は酸性側 (pH 4.5) とアルカリ性側 (pH 7.5) の 2 点に存在した。また、アワ、小麦に存在する PNPase の至適 pH は、酸性側 (pH 5.5) にのみ認められた。

4. 発芽部位における nuclease 活性の分布

前項で用いた各種発芽体をそれぞれ根、茎、子葉 (または胚乳) の各部分に分け、これらより調製した各酵素液を、5'-NpT, DNPP, RNA, PNPP などの基質に対しては pH 4.5 と 7.5 の 2 点で、5'-ADP に対しては pH 5.5 でそれぞれ作用させ、各基質に対する活性の分布を比活性をもって Fig. 3 に示した。この結果、いずれも RNA に対して活性を示すが、緑豆では各部とも 5'-NpT に対する活性が最大であった。また、緑豆と小麦は、DNPP に対しても同様にかなり強い活性を示した。特に小麦、アワの根には PNPase 活性が強く認められた。全般的に、比活性では子葉 (または胚乳)、茎、根の順に高くなる。

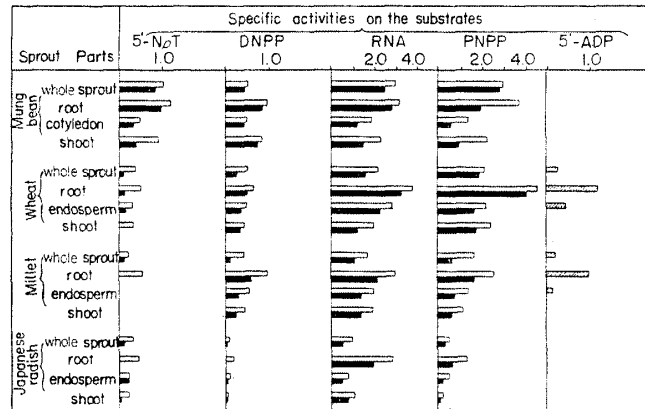


Fig. 3. Distribution of enzymatic activities in the parts of some sprouts.

The specific activities in the parts of some sprouts were indicated as follows.

Specific activities : Enzymatic activity/O.D. at 280mμ.

PDase (5'-PDase) : Reaction mixture containing 1μmole Ca DNPP (5'-NpT), 2.0 ml (0.2 ml) of buffer solution and 0.1 ml (0.2 ml) of enzyme solution was incubated at 37°C for 30 min. After stopping the reaction by adding 1N NaOH and centrifugation, optical density of the supernatant was measured at 420mμ. The details are shown in the text.

▬ incubated at pH 4.5  
▬ " pH 7.5  
▬ " pH 5.5

## 考 察

本報で供試した植物種子発芽体には、すべてにわたって nuclease 活性が存在した。供試種子は、主として食用または飼料用種子の中から任意に選んだものである。したがって、別種の植物種子発芽体についても、同様に nuclease 活性が存在するものと思われる。

供試発芽体には、小麦、ライ麦、大麦、緑豆、大根などのように、nuclease 活性が強いものと、黒豆、インゲン豆、ソバなどのように、比較的活性の弱いものや、また、大麦、マイロ、大根などのように、強い phosphatase 活性を有するものなどが認められたが、仮に穀類、豆類、雑穀類などのように分類すれば、これらの活性は必ずしもこのような分類にしたがう傾向はみられなかった。しかしながら、RNA の分解生成物についてみれば、5' 体を生成するものと、ごく一部ではあるが 5' 体を生成しないものがみられたことより、さらに分解生成物を精査することによって、微生物などの場合と同様に、植物種子発芽体についても、5' 体のみを生成する群、あるいは 5' 体と 3' 体を併成する群、あるいは 3' 体のみを生成する群などのように分類することができるのではないかと推察される。

つぎに、Table 2 において、未発芽種子とその発芽体、または成長を完了した植物部分の nuclease 活性を比較したが、単に呼吸作用のみを営み成長を停止している植物種子、または植物部分から抽出される酵素と、旺盛な物質代謝によって成長過程にある発芽体から抽出される酵素とは、当然のことながら、活性量にかなりの差がみられた。

これらの発芽体から抽出された酵素液の RNA および PNPP 基質に対する至適 pH は、いずれも酸性側 (pH 4.5) とアルカリ性側 (pH 7.5) の 2 点にあることから、両域に少なくとも 2 種以上の nuclease と phosphatase が存在することは明らかである。とくに、植物種子発芽体のアルカリ性 nuclease については、従来、ほとんど酵素的諸性質が明らかにされておらぬことより、次報より、酸性 nuclease と対比しつつ、その性質を明らかにしてゆきたい。

つぎに、発芽体各部位における酵素活性の分布は、小麦およびアワの根に PNPase の活性が強く認められ、またアワには、根にのみ 5'-NpT に対する活性がみられた。このような現象は、緑豆および大根にはみられず、これらは植物種子の種類による特徴を示すものと考えられる。

## 要 約

25種の植物種子発芽体について、その nuclease を検索し、二、三の検討を加えた。

1. 植物種子発芽体には、nuclease ならびに phosphatase 活性が認められ、大部分が RNA を分解して 5'-mononucleotide を生成する。
2. RNase 活性は、種子そのものにも存在するが、発芽 3~4 日でその活性は最大となり、PMase 活性および RNA の消長も RNase 活性と同様な傾向がみられる。
3. 発芽体酵素液における RNase ならびに PMase 活性の至適 pH は、いずれも酸性 (pH 4.5) とアルカリ性 (pH 7.5) の両域にある。
4. 発芽体各部位における RNase, PDase, 5'-PDase, PMase などの活性分布は、比活性で比較した場合、子葉、茎、根の順に高くなる。

終りにのぞみ、本研究に際し、御校閲を賜った北海道大学水産学部齋藤恒行教授、ならびに本報告の発表を許可された当社竹井俊郎社長に深甚な謝意を彰します。なお、本研究の概要は、昭和42年4月4日、東洋大学で開催された日本農芸化学会大会において講演発表した。

## 文 献

- 1) Sung, S. C., Laskowski, M.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 506 (1962).
- 2) Stockx, J., Vandendriessche, L.: *Arch. Intern. Physiol. et Biochem.*, **69**, 493 (1961).
- 3) Stockx, J., Vandendriessche, L.: *ibid.*, **69**, 521 (1961).
- 4) Stockx, J., Vandendriessche, L.: *ibid.*, **69**, 545 (1961).
- 5) Walters, T. L., Loring, H. S.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2870 (1966).
- 6) Hara, M., Hiramatsu, T.: *Biochim Biophys. Acta*, **30**, 215 (1958).
- 7) 守: 広島大学教育学部紀要, 第3部, 25 (1963).
- 8) 石井, 杉本, 横塚: 農化, **41**, 340 (1967).
- 9) 石井, 杉本, 横塚: 農化, **41**, 348 (1967).
- 10) Ibuki, F., Aoki, A., Matsushita, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 316 (1963).
- 11) Kessler, B., Chen, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 533 (1964).
- 12) Brawerman, G., Chargaff, E.: *J. Biol. Chem.*, **210**, 445 (1954).

- 13) Shuster, L.: *J. Biol. Chem.*, **229**, 289 (1954).
- 14) Shuster, L., Khorana, H. G., Heppel, L. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 452 (1959).
- 15) Wilson, C. M.: *ibid.*, **68**, 177 (1963).
- 16) Wilson, C. M.: *ibid.*, **76**, 324 (1963).
- 17) Garilhe, M. P., Laskowski, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 370 (1950).
- 18) Nakao, Y., Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 291 (1963).
- 19) Razzell, W. E., Khorana, H. G.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2105 (1959).
- 20) Matsushita, S., Ibuki, F., Mori, T., Hara, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 436 (1965).
- 21) Imada, A., Nakao, Y., Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 611 (1962).
- 22) 浅野: 蛋白核酸酵素 **5**, 158 (1960).
- 23) Ogata, K., Nakao, Y., Igarashi, S., Ômura, E., Sugino, Y., Yoneda, M., Suhara, I.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 110 (1963).
- 24) Kuninaka, A., Ôtsuka, S., Kobayashi, Y., Sakaguchi, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **23**, 239 (1959).
- 25) Buchanan, J. G., Dekker, C. A., Long, A. G.: *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3162.
- 26) 各務: 栄養, 食糧, 醸酵外国文献会誌, **13**, 922 (1962).

(昭43.9.11 受付)